UNTERSUCHUNG ZUR PROLIFERATION UND DIFFERENZIERUNG GETRENNTER THYMUS LYMPHOZYTEN MIT HILFE PHASENSPEZIFISCHER ZELLZYKLUS MARKER

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Dieter Leihener
aus Wuppertal-Cronenberg

1978

78 510

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0025

UNTERSUCHUNG ZUR PROLIFERATION UND DIFFERENZIERUNG GETRENNTER THYMUS LYMPHOZYTEN MIT HILFE PHASENSPEZIFISCHER ZELLZYKLUS MARKER

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Dieter Leihener
aus Wuppertal-Cronenberg

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 15.September 1978

Dekan: Prof.Dr.K.P.Hadeler

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. K. Zeiller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Braun

Meiner Frau

Die Experimente der vorliegenden Dissertation wurden von Mai 1975 bis Dezember 1977 unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. K. Zeiller am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, durchgeführt.
Direktor: Prof. Dr. F. Lynen

Herrn Prof. Dr. K. Hannig danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in der Abteilung für Biochemische Arbeitsmethoden.
Für wertvolle Ratschläge und wissenschaftliche Diskussionen bin ich Herrn Priv.-Doz. Dr. K. Zeiller sehr zu Dank verpflichtet.
Die Durchführung der zahlreichen Versuche war nur durch zuverlässige Assistenz von Frau R. Wiemeyer möglich.
Herrn Dr. V. Kachel danke ich für die zytofluorometrischen Messungen.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden veröffentlicht:

- Zeiller, K., Hansen, E., Leihener, D., Pascher, G. and Wirth, H.: Analysis of velocity sedimentation technique in cell separation. Influence of apparative and sample properties on separation power, resolution and sensitivity Hoppe Seyler's Z. Physiol. 317, 1309 (1976)
- Schindler, R.K., Leihener, D. and Zeiller, K.: Differentiation- and cell cycle markers of separated rat thymic lymphocytes.
  4th European Immunology Meeting, Budapest (1978)
- Schindler, R.K., Leihener, D., Zeiller, K. and Kachel, V.: Flow cytometrical analysis of rat thymocytes.
  VIth Engineering Foundation Conference on Automated Cytology, Schloß Elmau, W.-G. (1978)

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I	EINLEITUNG	1
1	Zur Differenzierung des Immunsystems	1
2	Lymphozyten Subpopulationen innerhalb des Thymus	2
3	Ziel der Arbeit	3
II	MATERIAL UND METHODEN	6
1	Untersuchungsobjekt	6
1.1	Versuchstiere	6
1.2	Zellpräparation	6
2	Zelltrennmethoden	7
2.1	1 g Sedimentation	7
2.1.1	Trennprinzip	7
2.1.2	Trennapparatur	7
2.1.3	Trennbedingungen	9
2.1.4	Auftragen von Zellen, Trennung und Fraktionierung	10
2.2	Zellelektrophorese	11
2.2.1	Trennprinzip	11
2.2.2	Trennapparatur	11
2.2.3	Trennbedingungen	11
3	Zellzahlbestimmung	13
4	Vitalitätstest	13
5	Elektronische Volumenbestimmung von Zellen	13

		Seite
6	Zytofluorometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes	14
6.1	Mithramycinfärbung	14
6.2	Simultane Messung der DNA-Fluoreszenz und des Zellvolumens	15
6.3	Auswertung der DNA-Histogramme	15
7	Charakterisierung der DNA-Synthese (S) Phase	17
7.1	^{3}H-Thymidin Markierung von Thymozyten in situ	17
7.1.1	Anästhesie und künstliche Beatmung der Ratte	17
7.1.2	^{3}H-Thymidin Infusion	18
7.1.3	Lichtmikroskopische Autoradiographie	19
7.1.3.1	Flüssigkeitsemulsionstechnik ("Dipping")	19
7.1.3.2	Färbung der Präparate	21
7.1.3.3	Quantitative Auswertung der Silberkornzahl	21
7.2	Aktivitätsbestimmung der Sialyltransferase	22
8	Blockierung der Metaphase mit Colcemid in vivo	23
9	Nachweis von Oberflächenantigenen	24
9.1	Prinzip	24
9.2	Antiserum	25
9.3	Zytotoxizitätstest	25
9.4	Absorptionstest	26
10	Mitogene Stimulierung	26
10.1	Zellkulturen	27
10.2	Messung der Stimulierung	27
III	ERGEBNISSE	28
1	Zelltrennungen	28
1.1	1 g Sedimentation	28
1.1.1	Volumen getrennter Zellen	29
1.2	Elektrophoretische Zelltrennung	31

		Seite
2	Zellzyklusanalyse	34
2.1	Bestimmung des DNA-Gehaltes von Thymozyten	34
2.1.1	DNA-Fluoreszenz ungetrennter Thymozyten	34
2.1.2	Verteilung von Thymuszellen einzelner Zyklusphasen nach 1 g Sedimentation	39
2.1.3	Verteilung von Thymuszellen einzelner Zyklusphasen nach elektrophoretischer Trennung	42
2.2	Spezifische Marker für einzelne Zellzyklusphasen	43
2.2.1	Blockierung der Metaphase durch Colcemid (in vivo)	43
2.2.2	Aktivitätsbestimmung der Sialyltransferase (S-Peak Enzym) getrennter Thymuszellen	48
2.2.3	Autoradiographische Analyse von pulsmarkierten Thymozyten (^{3}H-TdR) getrennter Fraktionen	52
2.3	Tabellarische Zusammenfassung aller Ergebnisse der Zellzyklusanalyse	56
3	Identifizierung der proliferierenden Populationen und Charakterisierung ihrer Differenzierungsstadien mit Hilfe subsequenter Trennungen (zweidimensional)	59
3.1	Elektrophoretische Beweglichkeit von S-Phase Zellen unterschiedlicher Sedimentationsraten	59
3.2	Vergleich der modalen Zellvolumina	62
3.3	Der Gehalt Thymus-spezifischer Antigene auf Zelloberflächen getrennter Populationen	65
3.4	Stimulierbarkeit der proliferierenden Population durch T-Zell Mitogene	68
3.5	Untersuchung zur Kinetik der proliferierenden Populationen	72
IV	DISKUSSION	74
1	Zusammenhang zwischen Sedimentationsgeschwindigkeit und DNA-Gehalt	74
2	Elektrophoretische Beweglichkeit als Ausdruck der Differenzierung von Subpopulationen	77

		Seite
3	Zur Identifizierung und Differenzierungsfolge der beschriebenen Subpopulationen	78
V	ZUSAMMENFASSUNG	83
VI	ABKÜRZUNGEN	85
VII	LITERATURVERZEICHNIS	86

I EINLEITUNG

1 Zur Differenzierung des Immunsystems

"Zwei Zellen sind voneinander differenziert, wenn sie bei gleichem Genom unterschiedliche Proteinmuster synthetisieren." So wurde der Begriff "zelluläre Differenzierung" im weitesten Sinne definiert (Jacob und Monod 1961) (1).
Die Reifung immunologisch aktiver, funktionell hochspezifischer peripherer Lymphozyten aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks, verläuft im Säugetierorganismus über eine Reihe von Differenzierungsschritten. Im Zusammenhang mit Untersuchungen dazu wurde in den 60er Jahren die wohl bedeutendste Erkenntnis über Lymphozyten gewonnen:

Immunologisch aktive Zellen sind nicht homogen, sondern bestehen aus zwei verschiedenen Zellpopulationen mit unterschiedlichen Aufgaben und Eigenschaften:
B-Lymphozyten reagieren auf antigenen Reiz mit einer humoralen Immunantwort, die sich im wesentlichen in der Produktion spezifischer Serumantikörper ausdrückt.

T-Lymphozyten reagieren mit einer direkten zellulären Immunantwort. Die als "fremd" erkannten Zellen werden lysiert und abgestoßen. Hierzu gehören Reaktionen vom sog. verzögerten Typ wie Allotransplantationsabstoßungen, Hautreaktionen vom verzögerten Typ oder Graft versus Host Reaktionen. Obwohl diese beiden Immunantworten ganz unterschiedlicher Natur sind, so stehen sie doch in enger Beziehung zueinander. Sie werden sorgfältig kontrolliert, indem B- und T-Lymphozyten ihre Aktivitäten gegenseitig in komplexer Weise regulieren.
Die funktionelle Dichothomie des Immunsystems - humorale und zelluläre Immunantwort - ist durch eine voneinander unabhängige ontogenetisch bedingte Dichothomie geprägt.
B-Lymphozyten reifen bei Vögeln in einem besonderen Organ, der bursa de fabricii und bei Säugetieren in einem funktionell äquivalenten Organ, möglicherweise dem Knochenmark.

Es wird inzwischen allgemein postuliert, daß T-Lymphozyten ihren Ursprung im Thymus haben, und daß normalerweise kein anderes Organ der Reifung dieser Zellen dient. Dabei unterscheidet man zwei wesentliche Schritte:

1) die Differenzierung einwandernder Stammzellen oder Pro-Thymozyten des Knochenmarks zu immunologisch unreifen Thymozyten und
2) die subsequente Reifung von Thymozyten zu immunologisch aktiven T-Lymphozyten, die den Thymus verlassen und im Blutstrom zirkulieren.

2 Lymphozyten Subpopulationen innerhalb des Thymus

Zum besseren Verständnis der Ergebnisse einer großen Anzahl von Untersuchungen, die sich mit der Heterogenität und Reifung von Lymphozyten innerhalb des Thymus beschäftigen, soll kurz auf die Mikroanatomie dieses Organs eingegangen werden (2-4). Der Thymus läßt sich in eine Rindenzone (Cortex) und in eine Markzone (Medulla) einteilen. Sein Gerüst besteht aus spezialisierten epithelialen Zellen, Bindegewebe und einem differenzierten Gefäßsystem. Die Cortex wird lediglich von eng zueinander liegenden Kapillaren versorgt, die für große Moleküle und Zellen kaum durchlässig sein dürften und von Arteriolen des cortico-medullären Bereiches abzweigen. Sie laufen zurück in medulläre Bereiche und münden in postkapillare Venülen, die für den Ein- und Austritt von Makromolekülen und Zellen durchlässig zu sein scheinen. Mark- und Rindenzone sind angefüllt mit Lymphozyten. Während die äußere Rindenzone vorherrschend große und mittelgroße Zellen enthält, ist der mittlere Bereich der Cortex dicht mit kleinen Lymphozyten gepackt. In der Medulla ist die Anzahl der Zellen wesentlich geringer; sie enthält jedoch Lymphozyten aller Größen mit einem Übergewicht an mittleren und kleinen.

Entsprechend der unterschiedlichen Charaktere experimenteller Ansätze

sind Thymuszellen der Maus in verschiedene Subpopulationen eingeteilt worden:

Die Mehrheit aller Lymphozyten reagieren auf Corticosteroide mit Zytolyse (5). Diese Subpopulation besteht aus kleinen Zellen, die in der Cortex lokalisiert und immunologisch inaktiv sind. Sie zeichnen sich durch hohen Gehalt an Thymus- und Lymphozyten spezifischem Antigen (θ und Ly) aus, besitzen aber weniger H-2 Antigen als periphere T-Lymphozyten auf ihrer Zelloberfläche (6). Sie gelten als "unreif" und werden in peripheren lymphatischen Organen nicht angetroffen.

Eine kleinere Subpopulation (10-20 % aller Thymus-Lymphozyten) gilt als relativ unempfindlich gegen Corticosteroide. Sie besteht aus größeren, auch gegen Bestrahlung relativ resistenten Zellen, die ihren Sitz hauptsächlich in der Medulla haben (7,8). Ihr Gehalt an θ- und Ly-Antigenen ist geringer als der cortikaler Thymozyten, während die Menge an H-2 Antigenen auf der Zelloberfläche zunimmt (9,10). Sie zeigen immunologische Aktivitäten in positiven GvH Reaktionen (7,11), "Helfer"-Aktivitäten bei humoraler Antikörperproduktion von B-Lymphozyten (12) und lassen sich mit T-Zell Mitogenen in vitro stimulieren (13). Sie gelten als "reifer", da sie bereits sehr ähnliche Eigenschaften wie immunkompetente, periphere T-Lymphozyten aufweisen.

Andere Untersuchungen beschäftigen sich mit der mitotischen Aktivität von Thymuslymphozyten. Sie führten zu einer Einteilung in große und mittelgroße sich teilende Zellen (15 % aller Thymozyten) und eine Population kleiner Zellen, die sich nicht teilt und die Mehrzahl aller Thymuszellen darstellt (14,15).

3 Ziel der Arbeit

Die meisten der genannten Untersuchungen über Thymuszellen wurden an isolierten Zellpopulationen durchgeführt, wie man sie durch Cortisongabe, Bestrahlung oder Antiserumbehandlung erhält. Die Nebenwirkung auf die "überlebenden Zellen" und ihre Funktion bleibt dabei unberücksichtigt, und die Zuordnung experimenteller Befunde zu bestimmten

Thymozyten ist wegen verbleibender Heterogenität der Testzellen schwierig.

Präparative Zelltrennmethoden hingegen können Zellen nach ihren physikalischen Eigenschaften voneinander trennen und charakterisieren. Sie ermöglichen eine weitere Analysierung vitaler Zellfraktionen. Diese Methoden sind dann besonders hilfreich, wenn sie eine Auftrennung des Zellgemisches auch in funktionell diskret verteilte Subpopulationen ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Methoden gewählt, mit denen Thymozyten nach ihren wesentlichen Funktionen - Proliferation und Differenzierung - getrennt werden können:

1) Die von Hannig (16-18) entwickelte trägerfreie Ablenkungselektrophorese, mit deren Hilfe Zeiller et al (19-21) differenzierte Zellen des Immunsystems trennen und charakterisieren konnte.
2) Die Methode der Zellsedimentation im Erdschwerefeld (22-24), die sich besonders gut zur Untersuchung proliferierender Zellen eignet (25-27).

Mit Hilfe der 1g Sedimentation konnte Shortman et al (28) Thymuszellen in proliferierende und nicht proliferierende Lymphozyten trennen. Andererseits konnte Zeiller et al (29, 30) nachweisen, daß elektrophoretisch getrennte Thymozyten unterschiedliche Differenzierungsstufen innerhalb der T-Zellreifung darstellen.

Es sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, mit Hilfe spezifischer Marker für Zellzyklusphasen innerhalb der Trennprofile - Elektrophorese und 1g Sedimentation - proliferierende Populationen nachzuweisen und diese durch Kombination der Methoden in subsequenten Trennschritten zu isolieren und identifizieren.

Solche spezifischen Marker sind nach der Definition von Mitchison (31) diskrete Ereignisse, die an einem bestimmten Punkt im Zellzyklus stattfinden.

Die Pulsmarkierung von Zellen in der DNA-Synthese-Phase (S-Phase) mit ^{3}H-Thymidin, die Aktivitätsbestimmung der Sialyltransferase als "S-peak Enzym" (32,33), die Blockierung der Metaphase mit Colcemid und die Bestimmung des DNA-Gehaltes von Zellen mit Hilfe der Zytofluorometrie, wurden als Methoden eingesetzt, die eine solche Markerqualität besitzen. Auf diese Weise sollte zusätzlich versucht werden, Überlappungen der proliferierenden Subpopulationen in den Trennprofilen zu erkennen, die durch intrazyklische Variationen biophysikalischer Eigenschaften der Zellen wie Volumen, möglicherweise Dichte und Oberflächenladung zustande kommen können.

Darüber hinaus sollte der Reifegrad und die Entwicklungsfolge dieser Subpopulationen durch Untersuchungen des Antigengehalts der Zellen und ihrer Stimulierbarkeit durch T-zellspezifische Mitogene studiert werden.

Hinweise für die Existenz von mindestens zwei proliferierenden Lymphozyten-Subpopulationen im Thymus geben- neben den Arbeiten anderer Autoren (15,28,34-36) - vor allem die grundlegenden Untersuchungen von Metcalf et al (15), der große und mittelgroße proliferierende Thymozyten unterscheidet.

Alle Experimente der vorliegenden Arbeit wurden am Thymus der Ratte durchgeführt, da dieser für präparatives Arbeiten mehr Zellmaterial liefert, insbesondere bei der Analyse von Zellminoritäten innerhalb der Trennungen. Befunde bei der Ratte fügen sich im allgemeinen recht gut in das ausführlicher untersuchte Immunsystem der Maus ein (37-39).

II MATERIAL UND METHODEN

1 Untersuchungsobjekt

1.1 Versuchstiere

Bei allen Experimenten wurden isogene, männliche Wistarratten verwendet (Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg bei München). Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Versuche 8-10 Wochen alt, wogen ca. 150-200g und erhielten Standardnahrung und Trinkwasser ad libitum. Vor Inhalationsnarkosen bei operativen Eingriffen wurden die Ratten 12 Stunden nüchtern gesetzt.

1.2 Zellpräparation

Die Tiere wurden mit Äther getötet, der Brustkorb geöffnet und der Thymus blutfrei mit einer Pinzette entnommen. Anschließend wurde das Organ in TC Medium Puck G (Difco) mit Hilfe stumpfer Glasnadeln zerzupft, um die Thymuszellen aus ihrem Gewebeverband zu lösen. Durch dreimaliges Waschen der Zellen im gleichen Medium (10 Min., 150 x g) und Filtern durch Gaze, konnte eine Einzelzellsuspension hergestellt werden.

Die Zellen wurden unter optimalen physiologischen Bedingungen gewonnen (pH 7,2; 290 mosmol) und ständig bei 4°C auf Eis gehalten, um bakterielles Wachstum und die Aktivität lytischer Enzyme aus zerstörten Zellen zu hemmen. Ebenso konnte bei 4°C die Stoffwechselaktivität der Zellen herabgesetzt und somit ihr Differenzierungszustand weitgehend fixiert werden.

Wurden andere Puffersysteme und Aufbereitungstechniken gewählt, so werden sie bei der Beschreibung der Versuchsmethoden im einzelnen erwähnt.

2 Zelltrennmethoden

Zellen lassen sich auf Grund unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften, wie Volumen, Dichte oder Oberflächenladung, mit Hilfe spezieller Apparaturen präparativ voneinander trennen.

2.1 1 g Sedimentation

2.1.1 Trennprinzip

Unter der Erdbeschleunigung g sedimentieren sphärische Partikel in einem Medium konstanter Dichte und Viskosität mit der Geschwindigkeit:

$$S = \frac{2(p - p')}{9\eta} g r^2$$

(p: Partikeldichte, p': Mediumdichte, r: Partikelradius, η: Viskosität)

Unterscheiden sich Zellen wenig in ihrer Dichte, so lassen sie sich nach unterschiedlichen Volumina gemäß diesem Sedimentationsprinzip präparativ voneinander trennen. Eine Volumensverdoppelung, wie sie bei proliferierenden Zellen vorliegt, steigert die Sedimentationsgeschwindigkeit unter konstanten übrigen Bedingungen um den Faktor 1,59.
Zellsedimentation unter Erdbeschleunigung ist eine Technik, die zuerst von Mel et al (22) benutzt wurde. Peterson und Evans (23) entwickelten daraus eine allgemein gebräuchliche Trennapparatur. Miller und Phillips modifizierten die Methode und publizierten eine ausführliche Theorie über die Zelltrennung in stationären Flüssigkeitssäulen unter Ausnützung der Erdbeschleunigung g (24,40).

2.1.2 Trennapparatur

Für die vorliegenden Versuche wurde eine von uns weitgehend modifizierte Trennapparatur (41) verwendet, wie sie in Abb. 1 schematisch dargestellt ist. Das Sedimentationsgefäß besteht aus einem Jenaer-

Glas-Zylinder von 150 mm Höhe und 186 mm Durchmesser, der auf einem mit Teflon beschichteten, konisch zulaufenden Metallboden steht. Im Boden befindet sich eine zentrale Öffnung (1,6 mm Durchmesser), über die das Gefäß gefüllt und nach erfolgter Sedimentation der Zellen entleert werden kann. Ein kleiner Pilz über dieser Öffnung verhindert das Rotieren des Mediums beim Leeren und Füllen des Gefäßes. In der Deckplatte, die durch ihre Verschraubung gegen die Bodenplatte den Glaszylinder fixiert, sitzen 25 regelmäßig verteilte Stahlkanülen.

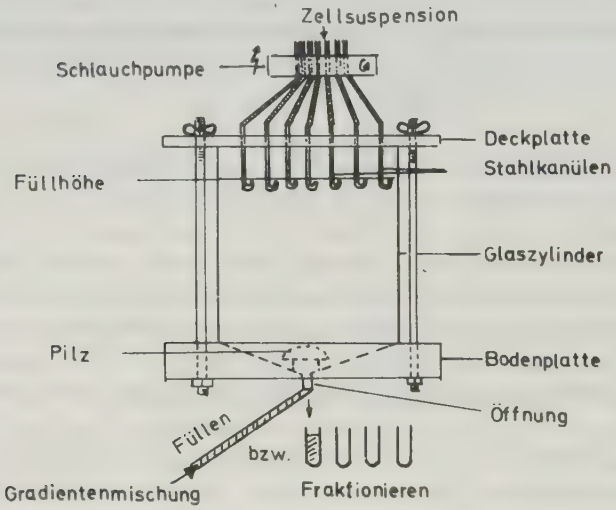


Abb. 1: Schematische Darstellung der Apparatur zur Trennung von Zellen im Erdschwerefeld

Die in das Sedimentationsgefäß ragenden Enden dieser Kanülen sind vertikal nach oben gebogen, um ein Einströmen der Zellen in den Gradienten beim Auftragen der Suspension zu verhindern. Die äußeren Enden der Kanülen sind mit Silikonschläuchen verbunden, die über eine peristaltische Schlauchpumpe (DESAGA, Heidelberg) zum Vorratsgefäß für die Zellsuspension führen.

2.1.3 Trennbedingungen

Als Sedimentationsmedium diente ein linearer Serumgradient: Kälberserum (ROTH, Karlsruhe) wurde bei 56°C inaktiviert, 1:80 v/v mit Milz-, Leber- und Blutzellen der Ratte absorbiert und mit TC Medium Puck G zu einer 20%igen Stammlösung angesetzt. Alle Lösungen wurden steril filtriert (0,2 µm Membranfilter, SARTORIUS) und auf pH 7,2 und 290 mosmol eingestellt.

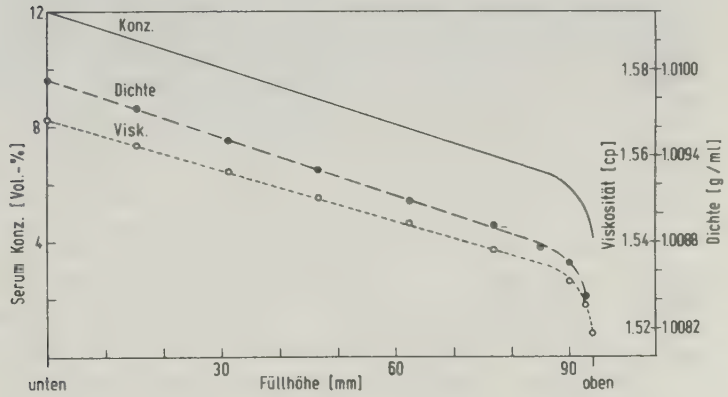


Abb. 2: Konzentration, Viskosität und Dichte des Serumgradienten im Sedimentationsgefäß

Ein Gradientenmischer (11 300 Ultrograd, LKB) bereitete aus der Stammlösung und TC Medium Puck G einen linearen Gradienten vorgegebener Steigung, dessen Serumkonzentration, Viskosität und Dichte in Abb. 2 dargestellt ist.
Entsprechend der hohen Füllgeschwindigkeit (bis zu 50 ml/Min.) wurde das Medium vor Eintritt in das Sedimentationsgefäß durch eine großvolumige Mischkammer (25 ml) gepumpt.
Nach Angaben von Miller et al (24) erwies sich ein Gradient mit rascher stufenartiger Anfangssteigung von 4% nach 7% ("buffered step") und folgender linearer Steigung von 7%-14% Kälberserum zur Bandenauftragung optimal. Ein unerwünschtes Einbrechen der Bande ("streaming") kann durch diesen "buffered step" verhindert werden.

2.1.4 Auftragen von Zellen, Trennung und Fraktionierung

Die nach 1.2 präparierten Zellsuspensionen wurden ein weiteres Mal in Puck TC Lösung gewaschen (10 Min. 150 g), durch Watte filtriert (Pasteurpipette) und auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. 50-100 ml Zellsuspension wurden über die Metallkanülen innerhalb von 10-15 min auf die Oberfläche des Gradienten geschichtet, nachdem dieser vorher zur Stabilisierung mindestens 2 Stunden ruhte. Alle Trennungen wurden bei $4^{o}C$ durchgeführt, um Thermokonvektion, bakterielles Wachstum und Metabolismus bzw. Proliferation der Zellen während der Trennung zu hemmen.
In der Regel wurden die Zellen nach einer Sedimentationszeit von 10-12 Stunden über die zentrale Öffnung im Boden des Gefäßes in Portionen zu 50 ml fraktioniert. Diese Menge entspricht nach der Geometrie des Gefäßes einer Füllhöhe von 1,84 mm. Somit kann die Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen entsprechender Fraktionen berechnet werden, wenn die gesamte Sedimentationszeit einschließlich der Fraktionierzeit bekannt ist.

2.2 Zellelektrophorese

2.2.1 Trennprinzip

Negative Überschußladungen auf der Zelloberfläche gegenüber dem Elektrolyten, bewirken die Wanderung von Zellen im elektrischen Feld gegen die Anode. Bei Lymphozyten ist die elektrophoretische Beweglichkeit zum größten Teil durch negative Ladungen endständiger N-Acetylneuraminsäuren an den Oligosaccharidketten der Membranglykoproteine bedingt und kann durch Behandlung der Zellen mit Neuraminidase vermindert werden (30,42-44).

2.2.2 Trennapparatur

Mit der von Hannig entwickelten Elektrophoreseapparatur (16-18) können Zellgemische, die bezüglich ihres Zetapotentiales (Oberflächenladungsdichte) Unterschiede aufweisen, präparativ voneinander getrennt werden.
Die vertikal stehende Trennkammer besteht im wesentlichen aus zwei in einem Abstand von 0,5-0,6 mm parallel angeordneten Spiegelglasplatten zwischen denen ein Pufferfilm von oben nach unten laminar strömt. Seitlich angebrachte Räume mit Platinelektroden, die von einem eigenen Puffer umspült werden, geben über Membranstreifen den elektrischen Kontakt mit dem Puffer in der Trennkammer. Das zu trennende Zellgemisch wird durch eine punktförmige Öffnung im oberen Teil der Kammer dem strömenden Medium gleichmäßig zugeführt und durchwandert ein horizontal angelegtes elektrisches Feld.

Zellen werden in Abhängigkeit ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit und der Strömungsgeschwindigkeit des Pufferfilms in verschiedenen Winkeln zur Anode abgelenkt und können über gleichmäßig horizontal angeordnete Öffnungen am Fuße der Kammer getrennt voneinander fraktioniert werden.

2.2.3 Trennbedingungen

Bei allen Trennungen wurde ein Elektrophoresegerät vom Typ ELPHO VAP FF5 (BENDER & HOBEIN, München) verwendet. Für optimale Trennungen

sind eine Reihe apparativer Faktoren zu beachten, insbesondere das Zetapotential der Glasplatten und die Zusammensetzung des Trennmediums (45). Um apparativ bedingte (Strömungsprofil, Elektroosmose) Schiefen der Histogramme zu vermeiden und maximale Auflösung zu erreichen, wurde das Zetapotential der Glaswände durch Beschichtung mit einer BSA-Lösung bzw. mit Polylysin dem der zu trennenden Zellen angeglichen (46). Als Kontrolle diente ein Testlauf mit Rattenerythrozyten, deren Trennprofil unter optimalen Bedingungen eine Normalverteilung darstellt (45). Alle Trennungen wurden unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt:

Trennkammerpuffer:	0,015 M Triäthanolamin
	0,01 M Glukose
	0,24 M Glyzin
	0,004 M Kaliumazetat
	pH 7,3 eingestellt mit Eisessig
	Osmolarität 290 mosmol
	Leitfähigkeit 9 x $10^{-4}\Omega^{-1}$x cm^{-1}
Elektrodenpuffer:	0,075 M Triäthanolamin
	0,004 M Kaliumazetat
	pH 7,3 eingestellt mit Eisessig
Pufferdurchflußrate:	550 ml/Std.
Kammertemperatur:	4-5°C
elektr. Feldstärke:	80-90 V/cm
Stromstärke:	250 mA

Bei gegebener Ionenstärke von 0,017 (47) ist die elektrophoretische Beweglichkeit von Zellen unabhängig vom Volumen und nur der Ladungsdichte proportional.

Vor der Trennung wurden die nach 2.1 präparierten Zellen im Trennkammerpuffer gewaschen (150 g, 8 min), durch Gaze filtriert, gegen Verklumpung mit DNA-se (RNA-se frei, WORTHINGTON, N.J.) behandelt und auf eine Konzentration von 5 - 6x10^7 kernhaltiger Zellen/ml eingestellt.

Jede Zelle befand sich ca. 200 sec im elektrischen Feld, bei einer Durchsatzrate von 2 - 4x10^8 Zellen pro Stunde.

Durch die Zugabe von Ca^{2+} und Mg^{2+} Ionen (0,3 mM) zum Trennkammerpuffer, wurde die elektrophoretische Beweglichkeit zwar leicht verringert (ca. 10%), aber die Vitalität und Struktur der Zellen in hohem Maße erhalten (45). Dies war für Zellkulturen mit getrennten Thymozyten von entscheidender Bedeutung. Die getrennten Zellen wurden in einer 2%igen Puck/BSA-Lösung aufgefangen und bei 4°C gehalten.
Die Stabilität der apparativen Bedingungen wurde vor und nach jeder Trennung durch Testläufe mit Rattenerythrozyten kontrolliert.

3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellkonzentration einzelner Fraktionen wurde ein elektronisches Partikelzählgerät vom Typ "Coulter Counter DN" verwendet.
Durch Verschiebung der Signalschwelle konnte zwischen Erythrozyten und größeren kernhaltigen Zellen unterschieden werden. Die Messung erfolgte in physiologischer Kochsalzlösung.

4 Vitalitätstest

Membrangeschädigte Zellen nehmen im Gegensatz zu vitalen Zellen den Farbstoff Trypanblau auf und lassen sich unter 100facher Vergrößerung im Lichtmikroskop gut erkennen.
Zum Test wurden 5 µl der jeweiligen Zellprobe mit der gleichen Menge 1%iger physiologischer Trypanblaulösung gemischt und der Prozentsatz blaugefärbter Zellen ermittelt.

5 Elektronische Volumenbestimmung von Zellen

Der Durchtritt eines nichtleitenden Partikels durch ein elektrisches Feld an einer Kapillaröffnung kann nach dem Coulterprinzip über eine Widerstandsänderung als Impuls registriert werden. Die Größe der Wi-

derstandsänderung ist der Partikelgröße direkt proportional und kann als diskreter Impuls in entsprechenden Kanälen elektronisch gespeichert werden.
Bei allen Versuchen wurde die Volumensmessung von Thymuszellen nach der Technik der hydrodynamischen Fokussierung in einem von Kachel entwickelten Volumenanalysator (METRICELL) durchgeführt (48). Die Messung erfolgte unter physiologischen Bedingungen in Puck G Lösung, um die native Größe der Zellen zu wahren.
In der Regel wurde eine Messöffnung der Größe 80 µm Durchmesser verwendet.
An das Gerät war ein Vielkanalanalysator (MSVAS-1105, AEG-TELEFUNKEN, Ulm) und ein X-Y-Schreiber (PACKARD) gekoppelt.
Mit Hilfe einer Eichkurve, die mit Polystyrenpartikeln (PARTICLE TECHNOLOGY, INC., Los Alamos) von 5 bzw. 7,9 µm Durchmesser gewonnen wurde, konnte jedem Kanal ein bestimmtes Volumen zugeordnet und somit die absoluten Zellgrößen bestimmt werden.
Rechtsschiefen der Volumenshistogramme sind bei dieser Messmethode nicht apparativ bedingt (48,49), sondern bedeuten Heterogenität der Zellen bezüglich ihrer Volumina.

6 Zytofluorometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes

Mit Hilfe geeigneter Fluorophore werden Chromosomen quantitativ gefärbt, so daß der relative DNA-Gehalt der Zelle über die Fluoreszenzintensität bestimmt werden kann.
Zytofluorometrische Messgeräte mit Durchflußsystemen erlauben eine rasche Analyse proliferierender Zellen, deren DNA-Gehalt sich im Verlauf der Synthesephase S zwischen den Phasen GO/G1 und G2+M verdoppelt.

6.1 Mithramycinfärbung

Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes getrennter und ungetrennter Thymozyten wurden Zellen, die in reiner Puck G Lösung resuspendiert waren, nach einer modifizierten Methode von Crissman et al (50) fixiert und ge-

färbt. Die Fixierung erfolgte durch Eintropfen von absolutem Äthanol in die Zellsuspension bis zu einer Alkoholendkonzentration von 70 % (45 min, bei R.T.). Danach wurden die Zellen zentrifugiert und in einer Puck G Lösung resuspendiert, die zur DNA-Färbung 100 µg/ml Mithramycin (FERRAK, Berlin) und 15 mM $MgCl_2$ enthielt.

6.2 Simultane Messung der DNA-Fluoreszenz und des Zellvolumens

Nach einer Färbedauer von mindestens 2 Stunden wurden die Zellen in der Färbelösung analysiert. Das von Kachel (51) entwickelte Gerät "FLUVO METRICELL" ermöglicht zytometrische Messungen zweier Parameter im Durchflußsystem:
Die DNA-Fluoreszenz und das Volumen werden an ein und derselben Zelle in der gleichen Messöffnung (70 µm Durchmesser) gemessen. Die beiden Parameter können gegen die Zellfrequenz entweder einzeln oder als dreidimensionale räumliche Verteilung dargestellt werden. Darüber hinaus läßt sich bei jedem beliebigen Kanal des Fluoreszenzhistogrammes die entsprechende Volumenverteilung der Zellen aufzeigen und umgekehrt.
Die Volumenmessung erfolgte auf elektronischem Wege, der unter Punkt 5 erläutert wurde.
Zur Fluoreszenzmessung wurde die zum Zellfluß axial gerichtete Epi-Beleuchtung nach Dittrich und Goehde benutzt (52). Die optische Grundausstattung wurde vom Phywe Instrument ICB 11 (PHYWE, Göttingen) genommen, dem eine Quecksilberlampe in Verbindung mit geeigneten Filterkombinationen als Anregungslichtquelle dient. Für Mithramycin lag das Anregungsmaximum bei 395 nm und das Emissionsmaximum bei 535 nm.

6.3 Auswertung der DNA-Histogramme

Abb. 3 zeigt, wie eine DNA-Verteilung, die man nach der Fluoreszenzanalyse erhält, nach einem einfachen geometrischen Verfahren ausgewertet werden kann (53,54):
Unter der Voraussetzung, daß proliferierende Zellen während der G0/G1

und G2+M Phase des Zellzyklus konstante, normalverteilte DNA-Mengen enthalten (55,56), spiegelt man die linke bzw. rechte schraffierte Hälfte Gauß'scher Verteilungen, ergänzt sie somit zu vollständigen Normalverteilungen und subtrahiert diese von der Gesamtkurve. Die resultierende Kurve ergibt in etwa die Verteilung aller Zellen, die sich in der S-Phase befinden. Durch planimetrische Auswertung der Kurven oder Integration der Zellzahlen entsprechender Kanäle, können die Anteile der Zellen einzelner Zyklusphasen prozentual ermittelt werden. Kompliziertere und wesentlich genauere Auswertungsverfahren (53) waren zur eindeutigen Interpretation der Versuchsergebnisse in Bezug zur Fragestellung nicht notwendig.

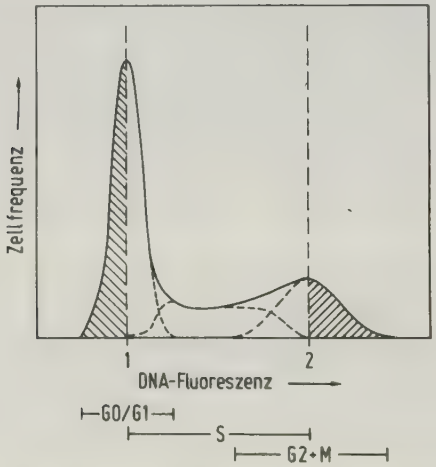


Abb. 3: Darstellung einer einfachen geometrischen Auflösung der DNA-Verteilung in einzelne Zellzyklusphasen.
Gauß'sche Kurven für G0/G1 und G2+M Zellen werden von der Gesamtkurve subtrahiert; die Differenz ergibt die Verteilung aller S-Zellen.

7 Charakterisierung der DNA-Synthese (S) Phase

7.1 ^{3}H-Thymidin Markierung von Thymozyten in situ

Obwohl Thymidin bei Säugetieren nicht als natürliche DNA-Vorstufe erscheint, kann es dennoch spezifisch in den DNA-Syntheseweg einmünden und im radioaktiven Zustand neu synthetisierte DNA markieren.
Um proliferierende Thymozyten zunächst in der S-Phase zu markieren (Pulsmarkierung) und darüber hinaus Zellteilung und Differenzierung mit Hilfe dieses Markers zu verfolgen, wurde den Zellen ^{3}H-Thymidin angeboten. Wegen der schwachen Durchblutung des Thymus wurde der üblichen i.p. Infusion des Isotops eine in situ Markierung vorgezogen, wodurch gleichzeitig die Gefahr der Radiolyse durch zu hohe Aktivitäten vermieden werden konnte.

7.1.1 Anästhesie und künstliche Beatmung der Ratte

Die direkte Markierung des Thymus kann nur am offenen Thorax durchgeführt werden und setzt eine künstliche Beatmung der Tiere voraus. Wie in Abb. 4 dargestellt ist, wurde die Operation nach einer modifizierten Methode von Weissman (34) durchgeführt:
In einem geschlossenen Gehäuse mit Überdruckventil wurden die Ratten durch Methoxyfluranbedampfung 10 min präanästhesiert. Dieses Ätherderivat (2,2-dichlor-1,1-difluor-äthyl-methyl-äther) von hoher Verträglichkeit konnte mit einem thermostatisch gesteuerten Evaporator (Connel 201, EISENHUT, Rheinfelden) gleichmäßig verdampft und mit Außenluft als Trägergas dem Tier zugeführt werden.
Nach erfolgter Narkose wurde eine Tracheotomie durchgeführt (57) und die künstliche Beatmung über einen speziellen Tracheotubus für Ratten (BRAUN MELSUNGEN) mit Hilfe einer Beatmungspumpe (Schuler Modell II, BRAUN MELSUNGEN) vorgenommen.
Die Kopplung des Methoxyfluranverdampfers an die Beatmungspumpe ermöglichte einen gleichmäßigen, beliebig langen Tiefschlaf der Tiere unter künstlicher Beatmung.

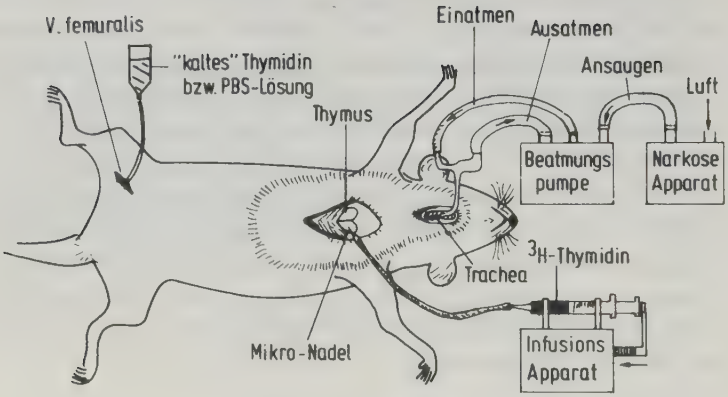


Abb. 4: Versuchsanordnung zur ^{3}H-Thymidinmarkierung von Thymuszellen in situ, unter dosierbarer Inhalationsnarkose und künstlicher Beatmung.

7.1.2 ^{3}H-Thymidin Infusion

Der Brustkorb der Ratte wurde geöffnet, der Thymus freigelegt und die Infusion von ^{3}H-Thymidin mit einer hypodermischen Kanüle an verschiedenen Stellen des Organs durchgeführt. Ein Infusionsapparat gewährleistet eine gleichmäßige, langsame Dosierung (160 µl/Std.).

Jede Thymushälfte erhielt innerhalb von 10 min 30-40 µl einer

"heißen" Thymidinlösung. Dies entsprach einer Konzentration von 0,4 µCi pro g Körpergewicht bei einer spezifischen Aktivität von 10 Ci/mmol (Radiochemical, AMERSHAM). Während der Infusion wurde den Tieren nach Angaben von Weissman (34) physiologische Kochsalzlösung über die Vena femuralis zugetropft (2 ml/Std.) und im Anschluß daran kaltes Thymidin in heparinisierter Kochsalzlösung (1 mg/ml) über den gleichen Weg nachgegeben.

Während der Dauer der Pulsmarkierung (1 Std.) wurde die künstliche Beatmung unter Narkose beibehalten. Bei längerer Inkubation (bis zu 72 Std.) mußten der Thorax und die Trachea durch eine einfache Naht wieder geschlossen werden.

Wegen des großen Vorteils einer gesteuerten Inhalationsnarkose mit gut verträglichem Anaesthetikum, gegenüber den Schwierigkeiten einer Nach- oder Überdosierung injezierter Barbiturate, konnten die Operationen rasch und mit geringer Ausfallquote durchgeführt werden.

7.1.3 Lichtmikroskopische Autoradiographie

7.1.3.1 Flüssigkeitsemulsionstechnik ("Dipping")

Zur quantitativen Auswertung des Einbaus von radioaktivem Thymidin in die DNA nach Pulsmarkierung, wurde die lichtmikroskopische Autoradiographie gewählt. (Bei Langzeitversuchen wurde der Einbau über die Ermittlung von cpm Werten mit einem Flüssigkeitsszintilationszähler gemessen). Zur Autoradiographie eignet sich Tritium als schwacher ß-Strahler besonders gut, da 99 % der emittierten Partikel von einer Photoemulsion absorbiert werden, die sich in 1 µm Abstand zum strahlenden Objekt befindet. Es kann eine besonders hohe Auflösung erreicht werden - die Silberkörner sind direkt über dem Zellkern lokalisiert und nicht über das Zytoplasma verstreut - wenn die Flüssigkeitsemulsionstechnik (Dipping-Technik) nach Joftes und Warren (58) angewandt wird:

Zunächst wurden von Pellets getrennter und ungetrennter Thymozyten in wenigen Tropfen fötalem Kälberserum (1:1 mit Puck G verdünnt) Ausstriche auf staubfreien, entfetteten Objektträgern angefertigt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden die Ausstriche für 10 Minuten in absolutem Methanol fixiert, 30 Minuten getrocknet und bei 30°C mit filtrierter (0,8 µm) Chromalaun-Gelatine-Lösung benetzt, um die Haftbarkeit der Photoemulsion zu erhöhen. (5 g Gelatine und 0,5 g Chromalaun in 1000 ml aqua dest.)

Nach ca. 2 Stunden waren die Objektträger trocken und konnten in der Dunkelkammer bei Rotlicht mit einer 40°C warmen Photoemulsion Ilford L 4 beschichtet werden.

Dazu wurde die Emulsion zunächst bei 50°C verflüssigt, im Verhältnis 1:1 mit 2%iger wässriger Glyzerinlösung verdünnt, durch dreifache Gazelage filtriert und zum Aufsteigen störender Luftblasen 30 min stehengelassen. Anschließend wurden die Objektträger langsam und gleichmäßig in die Photoemulsion getaucht, blasenfrei beschichtet und in waagrechter Lage getrocknet, um eine gleichmäßige Schichtdicke von 2-3 µm zu erhalten.

Nach frühestens zwei Stunden wurden alle Präparate in lichtdichte Boxen verpackt und bei 4°C im Kühlschrank der Exposition ausgesetzt. Als Trockenmittel war jeder Box ein Säckchen mit $CaCl_2$ beigefügt.

Nach einer Expositionszeit von 5-10 Tagen wurden die Objektträger folgendermaßen entwickelt:

1) Entwicklerbad bei Rotlicht und 20°C - 4 min
   (Kodak D 19)
2) Zwischenwässerung - 30 sek
3) Fixieren (Kodak Fixierpulver) - 10 min
4) Wässern in 6 aufeinanderfolgenden
   Bädern - 30 min gesamt

Für die Autoradiographie stand eine staubfreie Dunkelkammer zur Verfügung, die mit Rotlicht ausgestattet war und konstant bei 20°C und 45-50 % Luftfeuchtigkeit gehalten werden konnte.

7.1.3.2 Färbung der Präparate

Die Nachfärbung von Präparaten durch die Emulsion hindurch ist für die quantitative Auswertung von Vorteil, da das autoradiographische Ergebnis durch die Färbung nicht mehr zu beeinflussen ist (59).
Alle üblichen Techniken sind besonders nach Beschichtung durch "Dipping Verfahren" ohne Schwierigkeiten durchzuführen.
In den vorliegenden Versuchen wurde eine leicht modifizierte Färbung nach Pappenheim (May-Grünwald, Giemsa) gewählt, um Zytoplasma vom Kern differenzieren zu können.

7.1.3.3 Quantitative Auswertung der Silberkornzahl

Bei 100facher Vergrößerung im Lichtmikroskop wurde durch 4 Zählungen von je mindestens 100 Zellen pro Präparat der Prozentsatz an markierten Zellen (PMZ) visuell ermittelt. Eine Zelle galt als markiert, wenn die Anzahl der Silberkörner ("grains") über dem Kern den relativen Nullwert des Präparates übertraf. Dieser wurde bestimmt, indem auf vier im gleichen Abstand zur Zelle liegenden Flächen an mehreren Orten des beschichteten Objektträgers die durchschnittliche Silberkornzahl ermittelt wurde (Abb. 5).

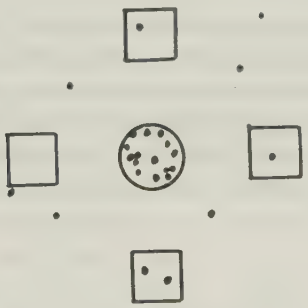


Abb. 5: Einfaches Verfahren zur Bestimmung des relativen Nullwertes von Autoradiogrammen.

Bei kurzen Expositionszeiten (5-10 Tage) lag dieser Nullwert sehr niedrig, so daß in der Regel die Zellen mit mehr als drei "grains" als markiert galten.
Darüber hinaus wurde der Prozentsatz aller markierten Zellen ermittelt, die mehr als 20 bzw. 30 "grains" aufwiesen, um die Einbaurate exogenen Thymidins pro Zelle zu untersuchen.

7.2 Aktivitätsbestimmung der Sialyltransferase

Die Sialyltransferase gehört nach Bossman (32,33) zu einer Reihe von Glykosyl-Transferasen, die bei synchronisierten Zellinien ein Aktivitätsmaximum im Verlauf der DNA-Synthesephase ("S") aufweisen. Nach der Nomenklatur von Mitchison (31) handelt es sich somit um ein "S-peak" Enzym und kann als phasenspezifischer Zellzyklusmarker eingesetzt werden.
Die Enzymaktivität getrennter Thymozyten wurde nach folgendem Reaktionsprinzip bestimmt:

$$\text{CMP-}(^{14}\text{C})\text{-N-Acetylneuraminsäure} + \text{GAL-Fetuin (desialysiert)}$$

$$\xrightarrow[Me^{++}]{+\ \text{Sialyltransferase}} \text{CMP} + (^{14}\text{C})\text{-N-Acetylneuraminsäure-GAL-Fetuin}$$

Zellen getrennter Fraktionen wurden in 0,01 M Kaliumphosphatpuffer, der 1 mmol $MgCl_2$ und 0,1 % Triton X-100 enthielt, lysiert und mit einem Glashomogenisator weiter aufgeschlossen. Nach Zentrifugation bei 10 000 g konnte aus dem Homogenat ein Überstand für die Analyse isoliert werden. Die Aktivität der Sialyltransferase im Überstand wurde nach dem Ansatz von Despont (44) bestimmt:

+ (EC 2.4.99.1; CMP-Acetyl-Neuraminsäure: D-Galactosyl-Glykoprotein N-Acetylneuraminyl-Transferase)

5 µl einer (^{14}C)-CMP-Sialinsäure-Lösung (= 0,125 µCi; 196 mCi/mmol, AMERSHAM BUCHLER, Braunschweig) wurden zu 100 µl Zellysat pipettiert. Hinzu kamen 10 µl einer optimierten Cofaktor-Lösung (5mmol $BaCl_2$) und 50 µl desialysiertes Fetuin (0,5 mg) (SIGMA) als exogener Akzeptor. Nach 2stündiger Inkubation dieses Gemisches bei 37°C im Wasserbad wurden 5 ml einer 10%igen Trichloressigsäure (TCA) hinzugegeben. Das ausgefällte Protein wurde auf Nitrozellulosefiltern (0,45 µm Porenweite, SARTORIUS) fixiert, dreimal mit 5%iger TCA und einmal mit Alkohol gewaschen und anschließend bei 60°C getrocknet.
Die Aktivität des Proteins auf den Filtern konnte mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt werden. Der Proteingehalt des aktiven Überstandes wurde nach einer modifizierten Lowry-Methode gemessen (60).
Dabei konnte durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat zum alkalischen Reagenz die Beeinträchtigung von Triton X-100 verhindert werden.
Von allen Fraktionen wurden doppelte Ansätze analysiert.

8 Blockierung der Metaphase mit Colcemid in vivo

Im Zusammenhang mit der Untersuchung zahlreicher Zellzyklusphänomene sind Inhibitoren, die in der Lage sind, Zellen selektiv in spezifischen Zyklusphasen zu blockieren, von großer Bedeutung.
Colcemid, ein Derivat des Herbstzeitlose-Alkaloids Colchicin, gilt als Spindelgift und verhindert deren Formation. Dies führt, wie Abb. 6 zeigt, zu einer Mitoseblockierung im Stadium der Metaphase und somit zu einer Akkumulierung von Zellen im G2/M Stadium des Zellzyklus bei längerer Einwirkung des Agenz.

Mehreren Gruppen von Ratten wurde nach 0;4 und 8 Stunden Colcemid (FLUKA, Buchs) in physiologischer NaCl (1 mg/ml, steril) intraperitoneal gespritzt. Jede Gruppe erhielt andere Konzentrationen (1-2,5 µg/g Körpergewicht), um ein dosisabhängiges Optimum der Metaphaseblockierung (61) zu ermitteln.

12 Stunden nach der 1.Gabe wurden die Tiere getötet und Thymuszellsuspensionen - wie unter 1.2 beschrieben - für Trennungen oder Volumenanalysen ungetrennter Zellen hergestellt.

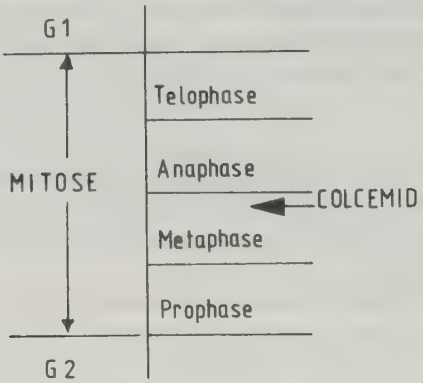


Abb. 6: Wirkungsort des "stathmokinetischen Agenz" Colcemid im Verlauf der Mitose

9 Nachweis von Oberflächenantigenen

9.1 Prinzip

Im Verlauf der ontogenetischen Entwicklung bilden sich auf Zelloberflächen antigene Determinanten (Glyko- und Lipoproteinkomplexe),die sich infolge selektiver Genaktivierung oder -derepression nach Funktion, Differenzierungs- und Reifungsgrad der Zelle unterscheiden (62).

Injeziert man einem Tier artfremde Zellen,so bildet es Antikörper gegen die als fremd erkannten Oberflächendeterminanten.Die Spezifizierung solcher Heteroantiseren gegen bestimmte Zellarten gelingt durch Absorption unerwünschter Antikörper während der Inkubation mit anderen Zellen (Kreuzabsorption).

Mit Hilfe solch spezifizierter Antisera gelang es, die morphologisch sehr homogenen Lymphozyten in funktionelle Untereinheiten zu klassifizieren (63-65), und z.B. bei der Ratte Thymozyten von peripheren T Lymphozyten mit Hilfe von Heteroantiserum zu unterscheiden (63,66).

9.2 Antiserum

Es stand ein Kaninchenserum vom Typ IgG gegen Ratten-Thymus-spezifisches Antigen zur Verfügung, welches nach Angaben von Zeiller et al (66,67) hergestellt war.
Nach Absorption mit Erythrozyten, Leber- und Lymphknotenzellen, wurde die Spezifität des Serums mit Kontrollzellen im zytotoxischen Test geprüft. Es reagierten 95-100 % Thymozyten, während nur ca. 15 % Lymphknoten- und Milzzellen lysiert wurden.

9.3 Zytotoxizitätstest

Die Reaktion von Antikörpern mit komplementären Zelloberflächenantigenen führt in Gegenwart von Komplement zur Zerstörung der Zellmembran und kann somit durch Trypanblaufärbung sichtbar gemacht und quantifiziert werden.
5 µl des Antiserums (bzw. Kaninchen-Normalserums zur Kontrolle) wurden mit 5 µl der zu testenden Zellsuspension (Targetzellen: $1{,}5 \times 10^7$ kernhaltige Zellen/ml) auf Mikrotiterplatten gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
Anschließend wurde 5 µl Meerschweinchenkomplement (BEHRINGWERK, Marburg) zugesetzt, gemischt und weitere 30 min bei 37°C inkubiert.
Mit Hilfe des Trypanblautestes (siehe 4.) wurde der zytotoxische Index (C.I.) bestimmt:

$$C.I. = \frac{100 \times (A - K)}{100 - K} ,$$

wobei A = % blauer Zellen im Ansatz mit Antiserum und K = % blauer Zellen in der Kontrolle.

9.4 Absorptionstest

Um geringe Mengenunterschiede thymusspezifischer Oberflächenantigene von Zellen getrennter Fraktionen zu erkennen, wurde der Absorptionstest nach Colley et al (68) angewandt.
Dabei wurde geprüft, in welchem Maße das Thymozyten-spezifische Antiserum (RALTG) durch Absorption mit Zellen getrennter Fraktionen seine Fähigkeit verliert, Standardzellen seiner Spezifität in Gegenwart von Komplement zu lysieren.
Sinkende Mengen von Testzellen wurden mit gleichen Volumina des bis zum Grenztiter verdünnten Antiserums 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (10 min, 200 x g) wieder abgetrennt.
Im Zytotoxizitätstest wurde die verbleibende Lysekapazität des absorbierten Antiserums gegen Standardzellen rückgetestet.
Die Absorptionskapazität getrennter Thymozyten ergab sich aus der Differenz der Anzahl lysierter Standardzellen durch unabsorbiertes und absorbiertes Antiserum. Die Aktivität unabsorbierten Serums (RALTG) wurde als 100 % festgelegt.

10 Mitogene Stimulierung

Werden Lymphozyten von Vertebraten sämtlicher Spezies in vitro mit verschiedenen Pflanzenlektinen oder Bakterienprodukten inkubiert, so reagieren sie mit erhöhter Proteinsynthese und Zellteilung.

Diese mitogene Stimulierung verläuft zwar in den Ereignissen der Zellveränderung ähnlich wie die immunogene Stimulierung, ist aber im Gegensatz zu dieser meist unspezifisch, polyklonal. Sie gilt als Modell für Genaktivierung und Induktion der Immunantwort und besitzt darüber hinaus Markerqualität für bestimmte Subpopulationen von Lymphozyten durch geeignete Wahl der Mitogene (69-71).

So lassen sich T-Zellen durch Phytohämaglutinin (PHA) und Concanavalin A (Con A) gut stimulieren, während B-Zellen mit diesen Mitogenen nicht reagieren.

10.1 Zellkulturen

Zellproben getrennter Thymozyten wurden mit Con A bzw. PHA verschiedener Konzentrationen in einem Medium folgender Zusammensetzung inkubiert:

88 ml RPMI 1640 Medium mit 2 g Na_2CO_3/1 (SEROMED)
10 ml fötales Kälberserum (inaktiviert, GRAND ISLAND BIO CO.)
1 ml Streptomycin (10 mg/ml, BAYER)
1 ml Penicillin (100 E/ml, HOECHST)
0,04 ml Ampholin (40 % w/v, LKB)

Aus dem fertigen Medium (pH Wert durch Einleiten von CO_2 auf 6,8 - 7,0 eingestellt) wurden 1 ml Kulturen hergestellt, die 10^6 kernhaltige Zellen der einzelnen Fraktionen enthielten. Jeder Probe wurde 0,1 ml Con A (2 µg/0,1 ml) bzw. PHA (62 µg/0,1 ml) zugesetzt. Die optimalen Konzentrationen waren mit Kulturen ungetrennter Thymozyten vorher ermittelt worden. Fünf Ansätze je Mitogen und Kontrollen ohne Mitogen wurden 48 Stunden in einem Brutschrank (FORMA SIENTIFIC, Ohio) bei 37°C und einem CO_2-Partialdruck von 5% inkubiert.

10.2 Messung der Stimulierung

Üblicherweise wurde das Maß der Stimulierung über den Einbau von radioaktivem Thymidin während der induzierten DNA-Synthese bestimmt.

Nach 48 Stunden wurde zu jeder Probe 0,1 ml einer ^{14}C-Thymidinlösung (60 mCi/mmol, RADIOCHEMICAL CENTRE, AMERSHAM BUCHLER, Braunschweig) pipettiert, entsprechend einer Radioaktivität von 0,114 µCi.

Nach Inkubation von weiteren 12 Stunden erfolgte die Ernte der Kulturen. Alle Proben wurden auf Glasfaserfilter abgesaugt, mit 5%iger TCA ausgefällt und mehrfach mit NaCl gewaschen. Die Radioaktivität der getrockneten Filter (60°C) wurde in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (ROTISZINT 11, ROTH, Karlsruhe) gemessen. Der Quotient aus den gemittelten cpm-Werten Mitogen-behandelter Proben und solchen von Leerwerten ergab das Maß der Stimulierung. Der beschriebene Versuch konnte in allen Schritten unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden.

III ERGEBNISSE

1 Zelltrennungen

1.1 1 g Sedimentation

Läßt man Thymuszellen der Ratte in einem Serumgradienten ca.12 Stunden sedimentieren, so erkennt man etwa 35 mm unter der Oberfläche des Mediums eine Bande, die nach oben scharf begrenzt ist, nach unten aber weit ausläuft und in ihrer optischen Dichte ständig abnimmt.
Durch Bestimmung der Zellkonzentration in den gewonnenen Fraktionen erhält man eine Häufigkeitsverteilung, wie sie in Abb. 7 repräsentativ für mehr als 30 Trennungen dargestellt ist.

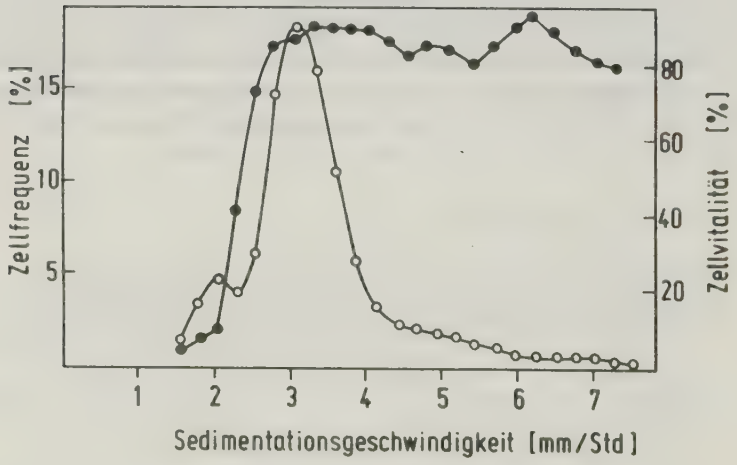


Abb. 7: 1 g Sedimentation von Thymuszellen der Ratte
(o-o) Häufigkeitsverteilung der Zellen nach 12stündiger Sedimentation; (●-●) Anteil (%) vitaler Zellen einzelner Fraktionen

Die Mehrheit aller Zellen (ca. 80 %) wandert mit geringer Sedimentationsgeschwindigkeit und bildet ein Maximum bei 3,1 mm/Std. Die Asymmetrie des Histogramms in Form einer Schulter, wird durch einen geringeren Anteil aller Zellen (ca. 20 %) verursacht, die bei stetig abnehmenden Frequenzen Sedimentationsraten bis zu 7 mm/Std. aufweisen.

Der kleine "peak" bei 2 mm/Std. enthält nach Werten der Vitalitätskurve (Abb. 7) bis zu 90 % tote Zellen, darüber hinaus noch Zellbruchstücke und wenige Erythrozyten (mikroskopische Kontrolle).

1.1.1 Volumen getrennter Zellen

Der Teilung von Zellen in der Mitosephase des Zellzyklus geht unter natürlichen Bedingungen eine Volumensverdoppelung voraus.

Um zu prüfen, inwieweit die Sedimentation von Thymuszellen eine Auftrennung nach Zellgrößen, und somit nach einzelnen Zellzyklusphasen (GO/G1, S und G2+M) mit sich bringt, wurden Zellvolumina einzelner Fraktionen gemessen (Abb. 8). Über die gesamte Verteilung (Frakt. 37-7) nehmen die Modi der Volumenshistogramme in Richtung der Sedimentation zu und ergeben Meßwerte zwischen 80 und 300 μm^3. Im Bereich "langsamer" Zellen (Frakt. 30-37) liegen annähernd normalverteilte Histogramme vor, deren mittlere Volumina nicht zunehmen, sondern konstant bei 85 μm^3 liegen. Es läßt sich daraus eine Population kleiner Thymuszellen erkennen, die das Maximum der Gesamtverteilung (Abb. 7) bildet und nach 12stündiger Sedimentation über diesen Fraktionsbereich streut.

Leichte Bi- und Trimodalitäten der Kurven (Frakt. 30-37) kommen lediglich durch Volumensignale von 2-3 aggregierten Zellen (mikroskopische Kontrolle) zustande und bedeuten nicht das Vorhandensein großer Zellen mit derart geringen Sedimentationsgeschwindigkeiten.

Durch sorgfältiges Waschen und Filtrieren der Zellen (eventuell DNAse-Behandlung gegen freigewordenes Chromatin toter Zellen) vor der Volumenanalyse, kann dieses Phänomen vermindert werden.

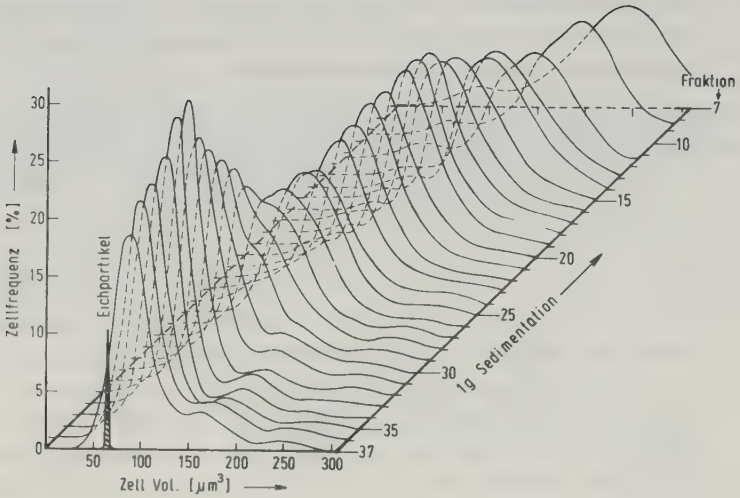


Abb. 8: Volumenhistogramme einzelner Fraktionen nach 1 g Sedimentation

Den einzelnen Meßkanälen wurde mit Hilfe von Eichpartikeln (Polystyrenpartikel, 5 µm Durchmesser (COULTER ELECTRONICS, Los Alamos) bestimmte Volumina zugeordnet.

Zellen höherer Sedimentationsrate (Frakt. 31-25) zeigen eine deutliche Asymmetrie in ihren Volumenverteilungen. Diese sind als Summe normalverteilter Zellen anzusehen, die sich in ihrem mittleren Volumen unterscheiden und mit unterschiedlichen Anteilen zur Gesamtverteilung beitragen. Solche Asymmetrien oder gar Bimodalitäten (Frakt. 26) bezüglich der Zellvolumina einer Fraktion, sind durch Heterogenität der Zelldichten zu erklären, wenn man von der Verklumpung kleiner Zellen während der Sedimentation absieht.

Polystyrenpartikel von gleicher Dichte, die in ihren Volumina sehr breit streuen, ergeben nach Sedimentation unter den beschriebenen Bedingungen normalverteilte Volumenhistogramme, deren Modalwerte mit steigenden Sedimentationsgeschwindigkeiten von Fraktion zu Fraktion gleichmäßig zunehmen (41).

Solche Verhältnisse sind in etwa im Bereich der Fraktionen 24-15 anzutreffen. Sie können vor allem für Zellen zutreffen, die sich in der DNA-Synthesephase (S-Phase) befinden und in ihrem Volumen kontinuierlich zunehmen (72).

Die größten Zellen mit hoher Sedimentationsgeschwindigkeit (Frakt. 14-7) zeigen wiederum asymmetrische Volumenverteilungen, mit teilweise schwach ausgeprägten Schultern, was erneut auf eine Heterogenität der Zelldichten hinweist. Diese Möglichkeit ist vor allem deshalb gegeben, weil im Bereich solcher Sedimentationsraten auch nichtlymphoide Zellen (Makrophagen, Retikulumzellen) ganz anderer Feinstruktur und Morphologie angetroffen werden (mikroskopische Kontrolle).

1.2 Elektrophoretische Zelltrennung

Mit Hilfe der trägerfreien Ablenkungselektrophorese werden Zellen - unter den beschriebenen Bedingungen (II 2,23) - unabhängig von ihrem Volumen nach der Dichte negativer Oberflächenladungen getrennt.

Das in Abb. 9 gezeigte asymmetrische Verteilungsprofil ist repräsentativ für mehr als 30 Trennungen von Thymuszellen 2-3 Monate alter Ratten unter konstanten experimentellen Bedingungen.

Eine Heterogenität bezüglich des Differenzierungszustandes der Zellen ist deutlich zu erkennen:
Die große Mehrheit aller Thymozyten wandert im Bereich langsamer elektrophoretischer Beweglichkeit (EB) und wird um sieben Fraktionen weniger stark zur Anode abgelenkt als Rattenerythrozyten, die als Marker für die relative EB betrachtet werden und den Bereich hoher EB charakterisieren.

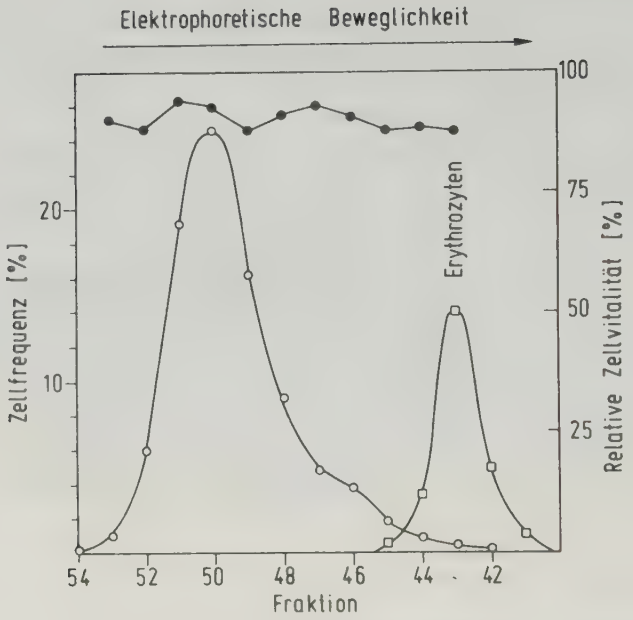


Abb. 9: Verteilungsprofil elektrophoretisch getrennter Rattenthymozyten

○—○ kernhaltige Zellen; □—□ Rattenerythrozyten die als elektrophoretischer Marker zusätzlich getrennt wurden; ●—● relative Vitalität getrennter Thymuszellen.

Eine Minderheit der Zellen verursacht die Asymmetrie der Verteilung in Form einer anodischen Schulter, die mit ständig abnehmenden Zellfrequenzen bis in den Bereich hoher EB hineinragt.

Insgesamt erstreckt sich die Trennung über 13 Fraktionen, die - wie der Vitalitätstest zeigt (Abb. 9) - relativ frei von toten Zellen, deren Verklumpungen und Zellbruchstücken (mikroskopische Kontrolle) sind, da solche günstigerweise in den Bereich höherer EB, der außerhalb des Trennprofils liegt, abgelenkt werden.

Die Normalverteilung von Rattenerythrozyten, die vor und nach den Thymuszellen getrennt wurden, beweist, daß keine apparativ bedingte Schiefe des Trennprofils vorliegt, sondern daß Thymozyten bezüglich ihrer Oberflächenladungsdichte und somit einer Membraneigenschaft heterogen sind.

2 Zellzyklusanalyse

2.1 Bestimmung des DNA-Gehaltes von Thymozyten

Das Antibiotikum Mithramycin eignet sich als Fluorophor, mit dem ausschließlich die DNA der Zelle auf einfache und rasche Weise angefärbt werden kann (50).
Im Vergleich zur aufwendigen Acriflavin-Feulgen Färbung werden z.B. von exponentiell wachsenden CHO Zellkulturen identische Fluoreszenzhistogramme gewonnen, die dem DNA-Gehalt der Zellen in entsprechenden Zyklusphasen direkt proportional sind (73).

2.1.1 DNA-Fluoreszenz ungetrennter Thymozyten

Um die Proliferationsaktivität des Thymus zu ermitteln, wurde zunächst die DNA-Fluoreszenz ungetrennter Zellen mit Hilfe des Zytofluorometers (Fluvo-Metricell) gemessen.
Im typischen DNA-Histogramm (Abb. 10) repräsentiert das Maximum der bimodalen Verteilung in Kanal 45 die große Anzahl aller diploiden Zellen der G1/GO Phase des Teilungszyklus, während der kleine Peak bei Kanal 90 (doppelte Fluoreszenzintensität), die Anzahl tetraploider Zellen der G2 und M-Phase widerspiegelt. Dazwischen liegen alle Zellen, die sich in der DNA-Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus befinden.

Ermittelt man im geometrischen Verfahren (siehe II, 6.3) die relativen Anteile der Zellen einzelner Zyklusphasen, so ergibt sich eine hohe Proliferationsaktivität für den Thymus der 2-3 Monate alten Ratte:

85,2 % aller Zellen befinden sich in der G1/GO-Phase,
9,2 % in der S-Phase und
5,6 % in der G2 bzw. M-Phase des Zellzyklus.

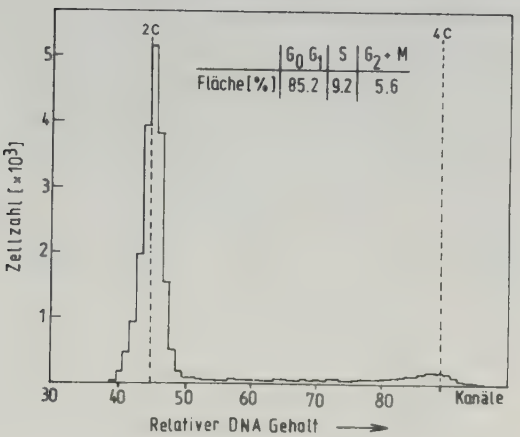


Abb. 10: Fluoreszenzhistogramm des relativen DNA-Gehaltes ungetrennter Thymozyten.
Die Modalwerte des DNA-Gehaltes diploider und tetraploider Zellen sind mit 2 C bzw. 4 C bezeichnet. Die Tabelle zeigt den prozentualen Anteil der Zellen einzelner Zyklusphasen, der durch Berechnung der Flächen unter der Gesamtverteilung gewonnen wurde.

Um korrekte Meßzahlen bezüglich tetraploider Zellen zu erhalten, mußte die Bildung von Zweieraggregaten während der Messung verhindert werden. (Zwei aggregierte diploide Zellen ergeben das Fluoreszenzsignal einer tetraploiden Zelle). Durch Variation der Zellkonzentration, Temperatur und Art der Filtrierung konnte mit reinen G1/GO-Zellen - die mit Hilfe

der 1 g Sedimentation hoch angereichert wurden (siehe Abb. 13a) - ein Fluoreszenzhistogramm gewonnen werden, dessen Variationskoeffizient 1,7 % betrug und dessen Anteil tetraploider (aggregierter) Zellen unter 1 % lag (Abb. 11).

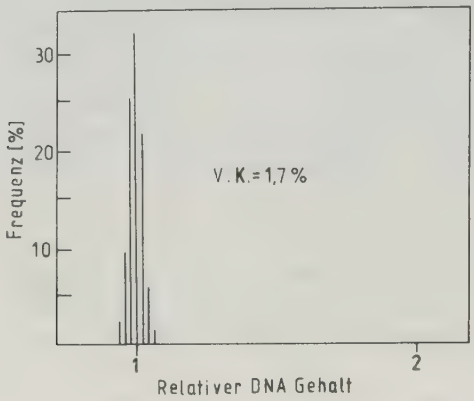


Abb. 11: Fluoreszenzhistogramm diploider Zellen der G1/GO-Phase des Zellzyklus.
VK = Variationskoeffizient; Modalwert diploider (1) und tetraploider Zellen (2)

Wird zur DNA-Fluoreszenz auch das Volumen ein und derselben Zellen mit Hilfe des "Fluvo-Metricell"-Apparates gemessen, so erhält man von ungetrennten Thymozyten eine zweidimensionale Verteilung wie sie in Abb. 12 a dargestellt ist.

Die relative Häufigkeit diploider GO/G1-Zellen gegenüber solchen in der S- bzw. G2+M-Phase ist deutlich wiederzuerkennen. Darüber hinaus zeigt sich auch eine hohe Volumenvariation der Zellen einzelner Zyklusphasen, was die Existenz von mehr als einer proliferierenden Zellpopulation im Thymus vermuten läßt.

Schneidet man das räumliche Verteilungsbild (Abb. 12a) an der Basis und läßt lediglich die DNA-Fluoreszenz gegen das Zellvolumen ausdrucken (Abb. 12 b), so erkennt man am diagonalen Verlauf der S-Phase Zellen die proportionale Zunahme beider Größen. Obwohl das native Volumen der Zellen durch Äthanol-Fixation vor der Mithramycinfärbung um ca. 25 % unterbewertet wird (74), so bleiben doch die relativen Größenunterschiede erhalten und somit die Volumenheterogenität der Zellen einzelner Zyklusphasen erkennbar.

Abb. 12a: Zwei-Parameter-Analyse (Volumen, DNA-Gehalt) von ungetrennten Thymozyten.
Äthanol-fixierte, Mithramycin-gefärbte Zellen wurden simultan in der gleichen Meßöffnung mit Hilfe des Fluvo-Metricell-Apparates gemessen.

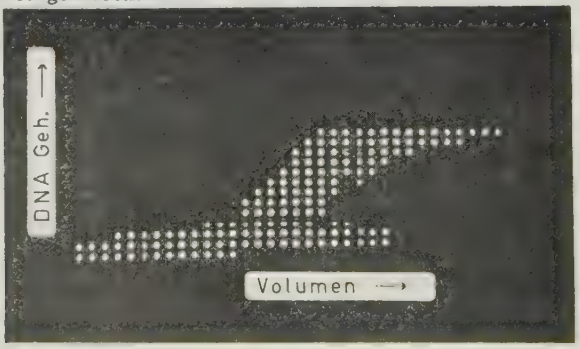


Abb. 12b: Basisschnitt der zweidimensionalen Verteilung in Abb. 12a.

2.1.2 Verteilung von Thymuszellen einzelner Zyklusphasen nach 1 g Sedimentation.

Nach der Trennung von Thymozyten mit Hilfe der 1 g Sedimentation (Abb. 7) wurde von jeder Fraktion ein DNA-Fluoreszenzhistogramm gewonnen und nach Anteilen der einzelnen Zyklusphasen - wie oben beschrieben - analysiert. Die jeweiligen Prozentwerte für Zellen der G1/GO-, S- und G2+M-Phase wurden mit der Anzahl kernhaltiger Zellen/Fraktion multipliziert und ergaben die tatsächlichen Häufigkeisverteilungen der Zellen einzelner Zyklusphasen im Sedimentationshistogramm.

In Abb. 13 a ist zu erkennen, daß Zellen der S- und G2+M-Phase in ihren Sedimentationsgeschwindigkeiten heterogen sind und Bimodalitäten der Verteilungen vermuten lassen. Zellen der G1/GO-Phase zeigen dagegen eine leichte Rechtsschiefe, die sich mit stetig abnehmenden Zellfrequenzen bis in den Bereich hoher Sedimentationsraten erstreckt.

Diese Form der Verteilung wurde mit hoher Reproduzierbarkeit erhalten, und ist zunächst einmal Ausdruck der in Abb. 12 b gezeigten Volumenheterogenität der Zellen einzelner Zyklusphasen. Darüber hinaus wird die Sedimentationsrate jedoch auch von der Dichte der Zellen beeinflußt, die möglicherweise zwischen proliferierenden Populationen und auch innerhalb der Zellzyklen variiert.

Berücksichtigt man die Dichte zunächst nicht, so kann die Verteilung von S-Phase Zellen nach 1 g Sedimentation als Abbild der Summe von überlappenden Altersverteilungen DNA synthetisierender Zellen bezüglich ihrer Volumina betrachtet werden. Die Zellfrequenz pro Fraktion ergibt sich aus der Summe aller gleichgroßen Zellen, die sich in verschiedenen Stadien der DNA Synthesephase befinden, und kommt vertikalen Schnitten innerhalb der in Abb. 12 b (Volumen gegen DNA-Gehalt) gezeigten Verteilung gleich.

Die besonders breite Streuung der Sedimentationsgeschwindigkeiten von S-Phase Zellen kann durch den hohen Volumenzuwachs während der DNA-Synthesephase (Verdoppelung zwischen G1-Phase und Mitose) erklärt werden.

Die angedeutete Bimodalität der Verteilung offenbart nicht unbedingt die Form der Verteilung von S-Phase Zellen einzelner proliferierender Populationen mit unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten.

Trägt man jedoch die Zellfrequenzen bei einem definierten DNA-Gehalt (1,5facher DNA-Gehalt von diploiden Zellen) aller Fraktionen gegen die Sedimentationsgeschwindigkeit auf, so erhält man - analog eines horizontalen Schnittes in Abb. 12 b - eine deutlich bimodale Verteilung des Sedimentationsprofils für diese S-Phase Zellen (Abb. 13b). Die Bimodalität bleibt auch erhalten, wenn man solche Verteilungen für andere S-Phase Stadien anfertigt, wobei sich beide Modi - als Ausdruck fortschreitender DNA-Synthese - zunehmend in Richtung höherer Sedimentationsraten verschieben.

Zellen der G2+M Phase des Zellzyklus sollten von hohen Volumenvariationen relativ frei sein, so daß ihre bimodale Verteilung im Sedimentationshistogramm (Abb. 13a) das Vorhandensein von mindestens zwei proliferierenden Subpopulationen nahelegt.

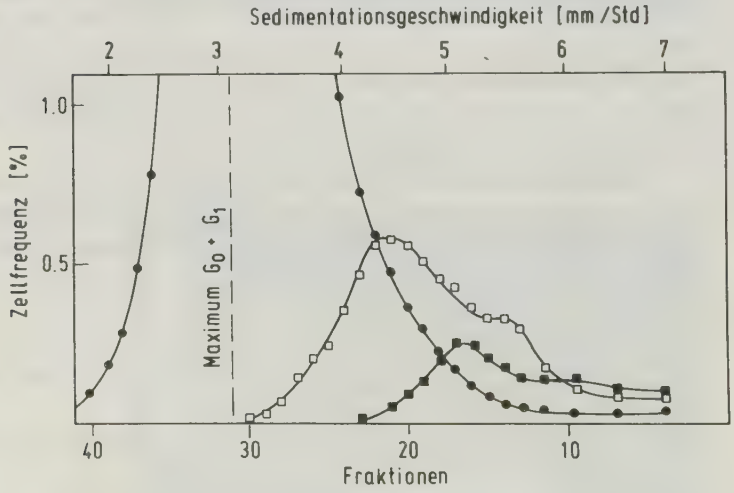


Abb. 13a: Verteilung von Thymozyten einzelner Zyklusphasen nach 1 g Sedimentation

Zellen der G1/GO- (●-●), S- (□—□) und G2+M Phase (■-■). Die Zellfrequenz bezieht sich auf die Anzahl aller Thymozyten. G1/GO Phase Zellen bilden das Maximum der Gesamtverteilung (Abb. 7).

Betrachtet man die relative Lage von S- und G2+M Phase Zellen zueinander (Abb. 13a), so läßt sich eine proliferierende Population geringer Sedimentationsgeschwindigkeit - im folgenden PS1 genannt - von einer solchen höheren Sedimentationsrate (PS2) trotz starker Überlaplung analytisch diskriminieren.

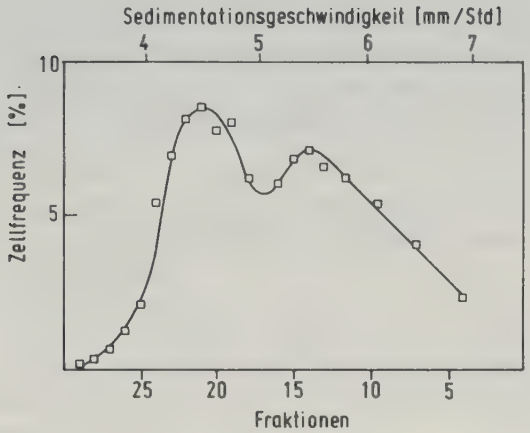


Abb. 13b: Sedimentationsprofil aller Thymuszellen, die sich in der Mitte der DNA-Synthesephase befinden (1,5 DNA)

Die Tatsache, daß alle Zellverteilungen einzelner Zyklusphasen im Bereich hoher Sedimentationsgeschwindigkeit (Fraktion 10, Abb. 13a) nicht nach Null gehen, ist durch die Kontamination proliferierender nicht lymphoider Zellen (Makrophagen, Retikulumzellen etc.) zu erklären.

2.1.3 Verteilung von Thymuszellen einzelner Zyklusphasen nach elektrophoretischer Trennung.

Fraktionen elektrophoretisch getrennter Thymozyten wurden auf gleiche experimentelle Weise - wie unter 2.1.2 beschrieben - nach Anteilen einzelner Zyklusphasen analysiert.

Es zeigte sich ebenfalls eine Bimodalität der S- sowie G2+M-Phase Zellen (Abb. 14), die sich aber vor allem durch ihre deutlichere Ausprägung von der in Abb. 13 a gezeigten Verteilung nach 1 g Sedimentation unterscheidet. Auch die Verteilung von G1/GO-Phase Zellen ist nicht lediglich rechtsschief sondern weist deutliche Schultern auf.

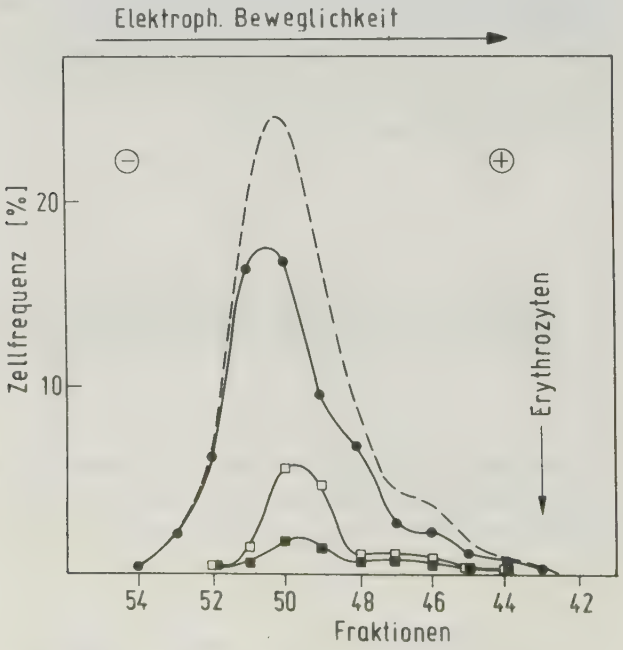


Abb. 14: Elektrophoretische Verteilung von Thymozyten einzelner Zyklusphasen.
Zellen der G1/GO- (●–●), S- (□–□) und G2+M-Phase (■–■); Verteilung aller Zellen (----)

Nach Definition der Trennmethode (Oberflächenladungsdichte der Zellen) haben unterschiedliche Zellvolumina keinen Einfluß auf die EB (elektrophoretische Beweglichkeit), so daß die Übereinstimmung der Modalwerte annähernd normalverteilter S- mit G2+M Phase Zellen im Bereich höherer wie niedriger EB als Ausdruck konstanter intracyclischer Oberflächenladungsdichte der Zellen zu betrachten ist.

Somit kann eine größere (Zellzahl) proliferierende Population (PE1) im Bereich geringer EB (7 Fraktionen langsamer als Erythrozyten) und eine kleinere proliferierende Population (PE2) im Bereich höherer EB (4 Fraktionen langsamer als Erythrozyten) postuliert werden, die präparativ voneinander trennbar sind.

Die Verteilungen der Zellen einzelner Zyklusphasen nach Anwendung beider Trennmethoden sind zum Teil sehr breit gestreut und die beschriebenen Bimodalitäten gemäß dem Grad der Überlappung nicht immer signifikant (Abb. 13a).

Dies liegt daran, daß die Zyklusphasen GO/G1, S und G2+M zwar durch den spezifischen DNA-Gehalt ihrer Zellen charakterisiert sind, ihre Verteilungsform in den Trennprofilen aber den Streuungen physikalischer Eigenschaften der Zellen wie Dichte, Volumen und Oberflächenladungsdichte entspricht.

Um die Eindeutigkeit der postulierten Populationen (PS1, PS2 bzw. PE1 und PE2) zu erhärten, wurde nach spezifischen Markern gesucht, die in der Lage sind, Ereignisse, welche an diskreten Punkten innerhalb der Zyklusphasen ein Maximum bilden, sichtbar zu machen.

2.2 Spezifische Marker für einzelne Zellzyklusphasen

2.2.1 Blockierung der Metaphase durch Colcemid (in vivo)

Colcemid vermag den Zellzyklus in der Metaphase innerhalb des G2+M-Stadiums zu blockieren (siehe Methoden: II,8) und eignet sich daher als ein solcher Marker.

Vergleicht man das Sedimentationsprofil von Thymozyten Colcemid-behandelter Ratten mit dem von unbehandelten Tieren (Abb. 16a), so erkennt man neben dem Modus der Verteilung (ca. 3 mm/Std) ein zweites signifikantes Maximum bei ca. 5mm/Std, welches mit dem Modalwert der G2+M-Phase Zellen von Population PS1 übereinstimmt.

Die Höhe der Akkumulation von Thymuszellen dieser Sedimentationsgeschwindigkeit ist abhängig von der Colcemiddosis und erreicht ein Optimum bei der i.p. Injektion von 2,0 µg/g Körpergewicht (Abb.15). Die Vitalitätskurve in Abb. 16a zeigt zwar bei Fraktion 20 einen leichten Einbruch, besagt aber, daß immer noch 80 % dieser akkumulierten Zellen vital sind.

Mit Hilfe der cytofluorometrischen Analyse konnte bewiesen werden, daß es sich bei diesem zweiten Maximum der Verteilung tatsächlich um die Anreicherung von Zellen der G2+M-Phase handelt (Abb. 16 a, b).

Darüber hinaus ist in diesem Bereich eine deutliche Abnahme der Anteile von S-Phase Zellen gegenüber Kontrollfraktionen zu erkennen.

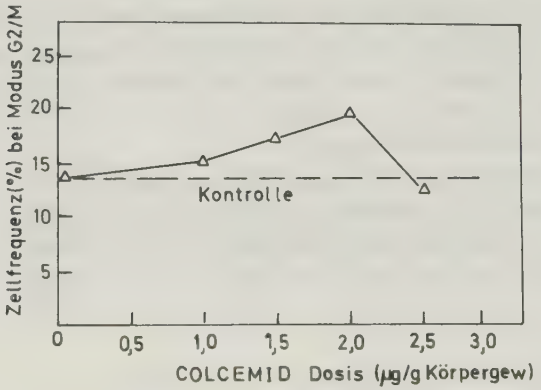


Abb. 15: Anreicherung mitotischer Thymuszellen in Abhängigkeit der Colcemiddosis.

I.p. Injektion nach 0, 4 und 8 Stunden;
Thymi nach 12 Stunden entnommen.

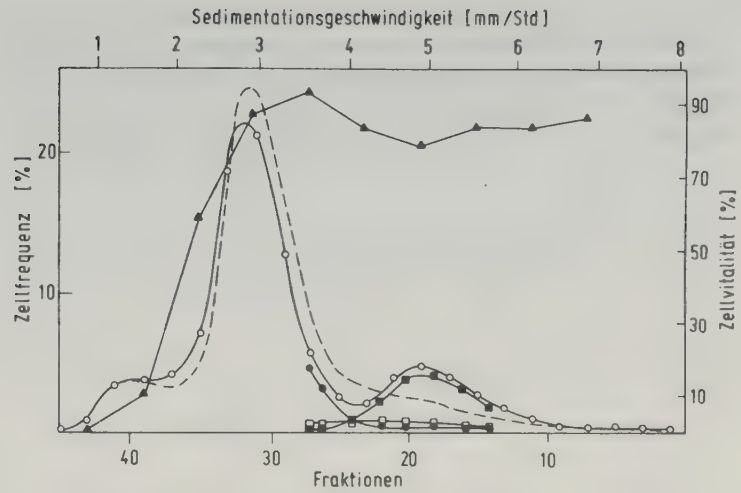


Abb. 16a: Bimodales Sedimentationsprofil von Thymozyten Colcemid-behandelter Ratten.

--- Verteilung aller Thymuszellen von Kontrolltieren

o–o Verteilung aller Zellen nach Colcemid-Behandlung (0,2 µg/g Körpergewicht nach 0, 4 und 8 Stunden)

■–■ G2+M-, □–□ S- und (●–●) G1/GO-Phase Zellen

▲–▲ Vitalitätskurve

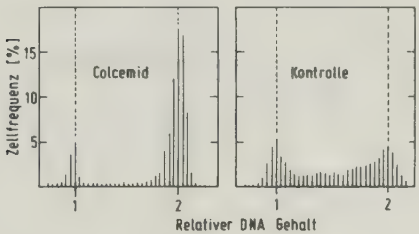


Abb. 16b: Relative Anreicherung diploider Zellen nach Colcemid-Behandlung.

DNA-Fluoreszenz-Histogramm der Peak-Fraktion 19, Abb. 16a

Bei der gleichen Art der Analyse (Abb. 17) zeigt sich auch im Verteilungsprofil elektrophoretisch getrennter Thymozyten von Colcemid behandelten Tieren ein signifikanter Anstieg von G2+M-Phase Zellen der Population PE1. Gegenüber der Kontrolle (Abb. 14) ist keine Verschiebung des Modus dieser angereicherten Verteilung festzustellen.

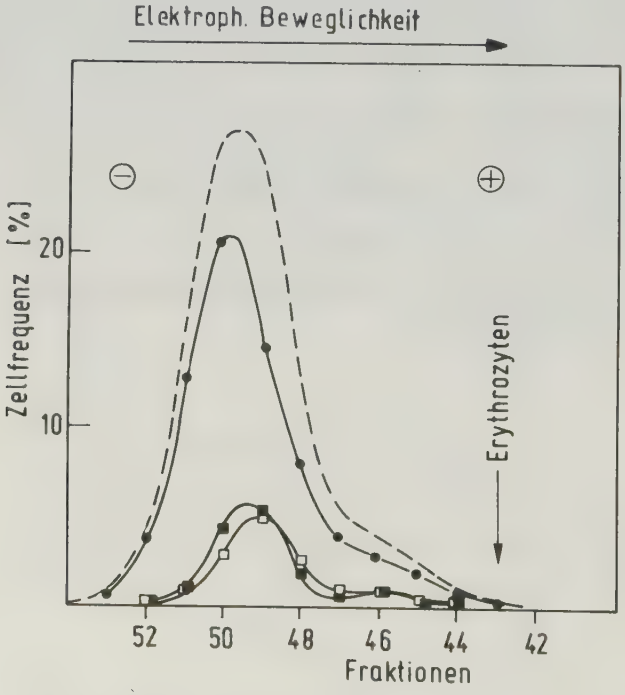


Abb. 17: Elektrophoretische Verteilung von Thymozyten einzelner Zyklusphasen nach Colcemid-Behandlung der Ratten.
Zellen der G1/GO- (●—●), S- (□—□) und G2+M-Phase (■—■);
---- Verteilung aller Zellen

Auch das Volumenhistogramm ungetrennter Thymozyten von Colcemid-behandelten Tieren zeigt im Gegensatz zur Kontrolle ein zweites Maximum (Abb. 18). Das Volumen der Zellen ist an dieser Stelle mit ca. 180 μm^3 etwas mehr als doppelt so groß wie das der überwiegenden Anzahl aller Thymuszellen (ca. 85 μm^3).

Dieser Befund charakterisiert einmal mehr den Anstau von G2/M-Zellen der "langsamen" Population PS1, wenn man die Sedimentationsgeschwindigkeit aus dem gefundenen Volumen kalkuliert (Volumensverdoppelung erhöht die Sedimentationsrate um 1,59).

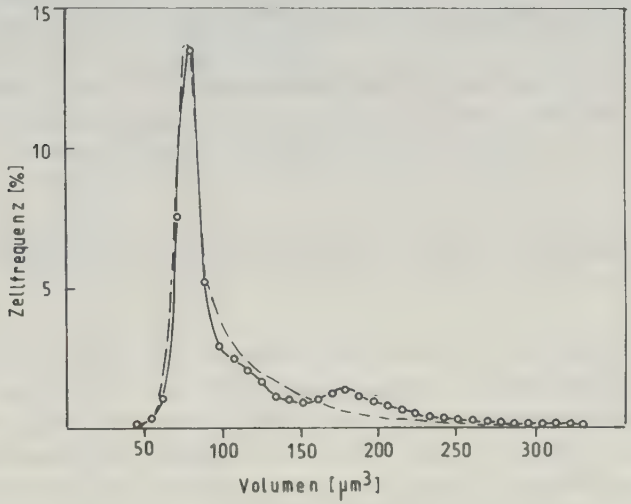


Abb. 18: Volumenhistogramm ungetrennter Thymozyten von Colcemid-behandelten Tieren.
o–o Colcemid-behandelte Tiere erhielten 0,2 µg/g Körpergewicht nach 0, 4 und 8 Stunden, Thymi nach 12 Stunden entnommen.
--- scheinbehandelte Tiere

Die Tatsache, daß weder nach 1 g Sedimentation oder Elektrophorese, noch nach der Volumenanalyse ungetrennter Zellen ein zweiter signifikanter Anstau der "größeren" bzw. "schnelleren" G2+M-Phase Zellen der Populationen PS2 bzw. PE2 gefunden wurde, läßt folgende Interpretationsmöglichkeiten offen:

1. Die beiden postulierten Populationen PS1 und PS2 bzw. PE1 und PE2 sind sequentielle Stadien der Reifung von T Lymphozyten.

2. Die Akkumulation der G2+M-Phase Zellen der Populationen PS 1 bzw. PE2 ist so gering, daß die eingesetzten präparativen und analytischen Methoden nicht empfindlich genug sind, sie zu erkennen.

3. Die Optimierung der Metaphaseblockierung (61) durch Colcemid bedarf für verschiedene Populationen (Zellinien) ganz unterschiedlicher Voraussetzungen (Konzentration, Behandlungsdauer).

2.2.2 Aktivitätsbestimmung der Sialyltransferase (S-Peak-Enzym) getrennter Thymuszellen.

Die Verknüpfung von N-Acetylneuraminsäure an Kohlehydratseitenketten von Glykoproteinen und Glykolipiden geschieht unter Einwirkung der Sialyltransferase im endoplasmatischen Reticulum. Das fertige Produkt wird in Form von Golgi Vesikeln an die Außenseite der Cytoplasmamembran befördert und trägt nach Fusion mit dieser zur negativen Ladung außenständiger Membranglykoproteine und -lipide bei (32).

Über diesen Mechanismus kann ein Zusammenhang zwischen Sialyltransferaseaktivität und elektrophoretischer Beweglichkeit der Zelle gesehen werden. Bosmann (32,33) fand bei synchronisierten Säugetierzellen (Mauslymphomazellen) die größte Anreicherung dieses Enzyms innerhalb der DNA-Synthesephase des Zellzyklus und stellte es nach der Nomenklatur von Mitchison (31) in die Reihe der "S"-Peak Enzyme.

In welchem zeitlichen Zusammenhang (Zellzyklusphasen) die Menge des Enzyms mit dem Maximum seiner Aktivität oder gar der Ausprägung einer erhöhten negativen Oberflächenladung der Zellmembran steht, ist weitgehend unbekannt.

Zur Charakterisierung der Verteilung von S-Phase Zellen nach beiden Trennungen (1 g Sedimentation, Elektrophorese) wurde die Aktivität der Sialyltransferase im Überstand lysierter Zellen einzelner Fraktionen im beschriebenen Ansatz (II, 7.2) bestimmt. Das Aktivitätsprofil nach 1 g Sedimentation ist erneut bimodal (Abb. 19). Die beiden Maxima sind mit denen der DNA-Fluoreszenzanalyse für S-Phase Zellen recht gut zur Deckung zu bringen. Auffallend ist jedoch die scharfe Diskriminierung beider Aktivitätsverteilungen innerhalb der sonst stark überlappenden S-Phasen der Populationen PS1 und PS2. Sie deutet darauf hin,

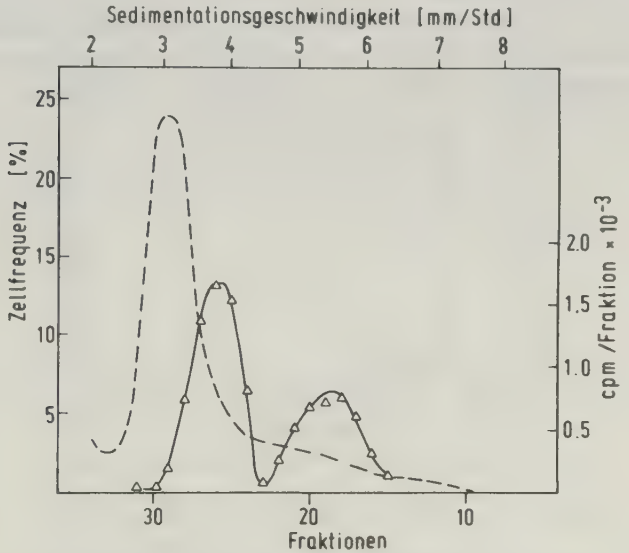


Abb. 19: Sialyltransferaseaktivität von getrennten Thymozyten (1 g Sedimentation)

----- Sedimentationshistogramm aller Zellen

Δ—Δ Enzymaktivität (cpm/Fraktion); Menge der gebundenen CMP-^{14}C-N-Acetylneuraminsäure.

daß die Sialyltransferase auch für proliferierende Thymozyten als S-Peak Enzym anzusehen ist. (Der mögliche Beitrag von G1/GO Zellen, die in diesem Bereich - wie Abb. 13 a zeigt - noch nachgewiesen werden, ist allerdings nicht ganz auszuschließen.)

Daß die beiden beschriebenen Maxima nicht Ausdruck von zwei Aktivitätsanstiegen des Enzyms innerhalb der S-Phase von nur einer proliferierenden Population sind (in früher und später DNA-Synthesephase), beweist die Abb. 20.

Der Anstau von G2+M-Phase Zellen Colcemid-behandelter Tiere liegt im Sedimentationsprofil zwischen den beiden Aktivitätsmaxima der Sialyltransferase, die im gleichen Ansatz bestimmt wurde. Eine Distanzvergrößerung zwischen den beiden Modalwerten der Enzymaktivität ist durch die relative Anreicherung von G2+M-Phase Zellen in den Sedimentationsbereichen ursprünglich gefundener Modalwerte (Abb. 19) zu erklären.

Die relative Lage aller drei Modi zueinander stützt weiterhin die Annahme, daß mindestens zwei proliferierende Thymussubpopulationen unterschiedlicher Sedimentationsgeschwindigkeit existieren.

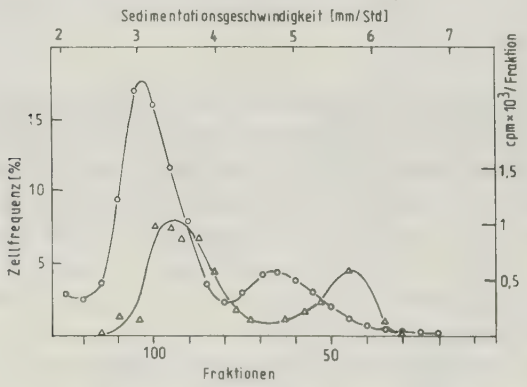


Abb. 20: Sialyltransferaseaktivität getrennter Thymozyten (1 g Sedimentation) von Colcemid-behandelten Tieren.
o—o Sedimentationsprofil aller Zellen
Δ—Δ Enzymaktivität (cpm/Fraktion)

Eine deutliche Zweigipfeligkeit der Enzymaktivität/Fraktion zeigt sich auch nach elektrophoretischer Trennung der Thymuszellen (Abb.21). Zwar sind die Modalwerte - gegenüber den Befunden der DNA-Analyse für S-Phase Zellen - um eine Fraktion in Richtung höherer EB verschoben, charakterisieren aber dennoch eine "langsame" und eine "schnelle" Population.

Insgesamt unterstützen die Ergebnisse der Enzymanalyse die Richtigkeit der Postulierung von je zwei proliferierenden Populationen PS1 und PS2 bzw. PE1 und PE2.

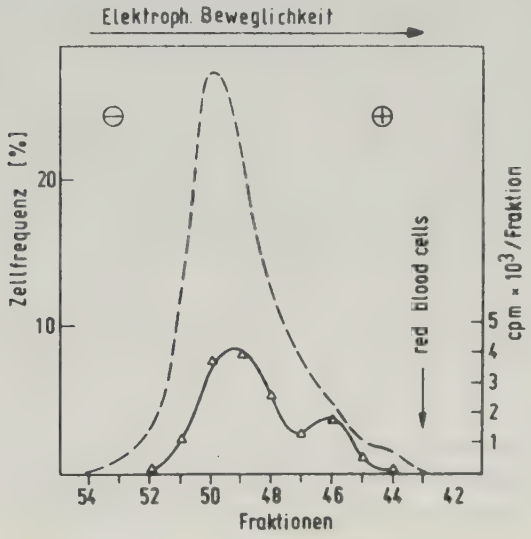


Abb. 21: Sialyltransferaseaktivität von Fraktionen elektrophoretisch getrennter Thymozyten.
---- Verteilung aller Zellen
▲–▲ Enzymaktivität (cpm/Fraktion)

2.2.3 Autoradiographische Analyse von pulsmarkierten Thymozyten (^{3}H-TdR) getrennter Fraktionen.

Exogenes Thymidin wird nach Phosphorylierung ausschließlich in die DNA der Zelle eingebaut und führt als ^{3}H-Thymidin zur Markierung neugebildeter DNA.

Nach einer in situ Pulsmarkierung (1 Std.) des Thymus mit ^{3}H-TdR werden somit nur solche Zellen radioaktiv gekennzeichnet sein, die sich in der DNA-Synthesephase des Zellzyklus befinden. Diese Tatsache wurde zu einer weiteren unabhängigen Charakterisierung der Verteilung von S-Phase Zellen innerhalb der beiden Trennprofile genützt.
Die autoradiographische Auswertung erlaubte - gegenüber der cpm-Wert Bestimmung von markierter DNA in Szintillationsflüssigkeit - die quantitative wie qualitative Bewertung der Markierung auf Einzelzellbasis (Abb. 23a,b).

Zunächst vermittelt diese Art der Analyse den relativen Anteil an markierten Zellen pro Fraktion. Wird dieser Wert mit der Zellzahl pro Fraktion multipliziert, so erhält man die "tatsächliche" Verteilung aller markierten Zellen des Thymus bezüglich ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit bzw. elektrophoretischen Beweglichkeit (EB) (Abb. 22 bzw. 24).

Bei Auswertung der Autoradiographien fiel auf, daß in manchen Fraktionen eine besonders große Anzahl hochmarkierter Zellen (>30 "Grains") vorhanden war (Abb. 23a), was zunächst den Einbau hoher Mengen markierten Thymidins charakterisiert. Ob dies ein Maximum des Einbauverhältnisses von markiertem exogenen zu endogenem Thymidintriphosphat darstellt, oder Ausdruck der DNA-Syntheserate ist - beides abhängig von der Wirkungsweise eines komplexen Enzymsystems - konnte bei diesen Untersuchungen nicht entschieden werden. Immerhin wird ein Ereignis charakterisiert, das innerhalb der DNA-Synthesephase ein Maximum aufweist. Wie die Abb. 22 und 24 zeigen, ist die Häufigkeitsverteilung aller markierten Zellen (>30 "Grains") nach 1 g Sedimentation und Elektrophorese eindeutig zweigipfelig und bestätigt ebenfalls die Existenz von mindestens je zwei proliferierenden Populationen.

An der Lage des Modalwertes in Fr. 21 der Abb. 22 ist zu erkennen, daß dieses Maximum der ^{3}H-TdR-Aufnahme im frühen Stadium der S-Phase einer Population stattfindet. Der zweite Peak in Fraktion 13 gibt darüber keine klare Auskunft, entsprechend der Kontamination von schnell sedimentierenden nichtlymphoiden S-Phase Zellen.

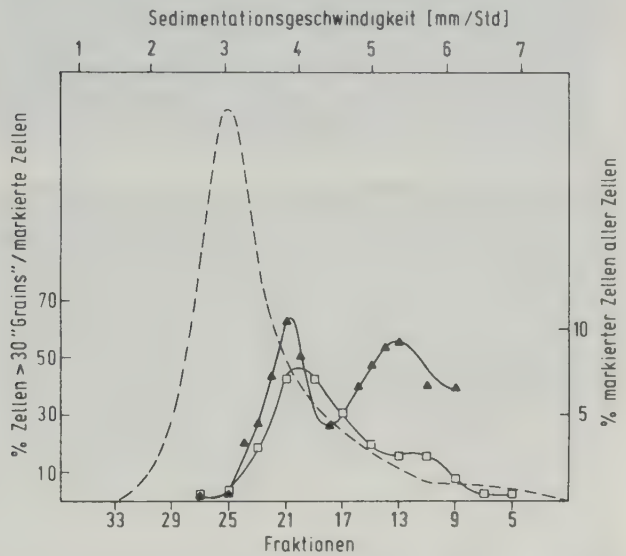


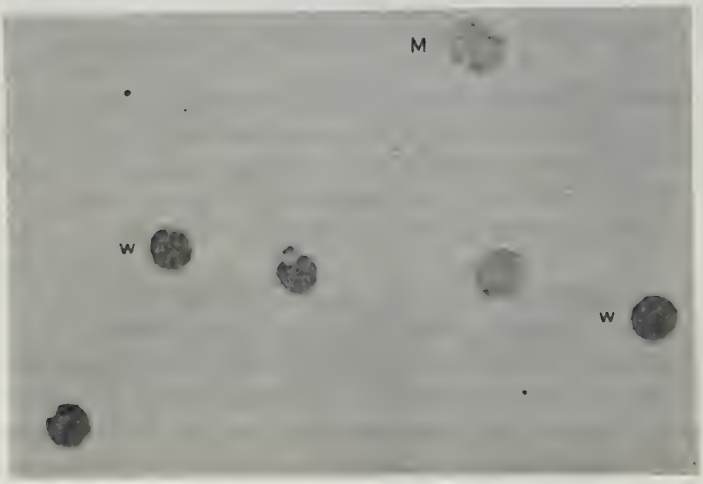
Abb. 22: Häufigkeitsverteilung pulsmarkierter (^{3}H-Thymidin) Thymuszellen nach 1 g Sedimentation.

□–□ % markierte Zellen aller Thymozyten

▲–▲ % hochmarkierte Zellen (> 30 Grains) aller markierten Zellen

--- Sedimentationsprofil von Thymozyten

a)



b)

Abb. 23: Autoradiogramme von pulsmarkierten [^{3}H]-Thymidin Thymuszellen.
(Ilford L 4; Expos. ca. 10 Tage)
Lichtmikroskopische Darstellungen nach May-Grünwald/Giemsa Färbung (100fache Vergr., Öl)

a) hochmarkierte (h) neben wenig markierten (w) Thymozyten der Peakfraktion 21 in Abb. 22

b) Fraktion 17 (Abb. 22); Bereich mitotischer Zellen (M), Minimum der Verteilung von hochmarkierten Zellen

Im Falle der elektrophoretischen Trennung (Abb. 24) stimmen die Modalwerte der Verteilungsprofile hochmarkierter Zellen (> 30 Grains) mit denen der Verteilung aller markierten Zellen (% markierte Zellen) überein. Dies weist darauf hin, daß die Zellen der postulierten Populationen (PE1 und PE2) innerhalb der DNA-Synthesephase keine Variation der EB aufweisen. Die gefundenen Profile scheinen Ausdruck von zwei leicht überlappenden, natürlich streuenden "S"-Zellverteilungen zu sein, die sich in ihrer Oberflächenladungsdichte unterscheiden.

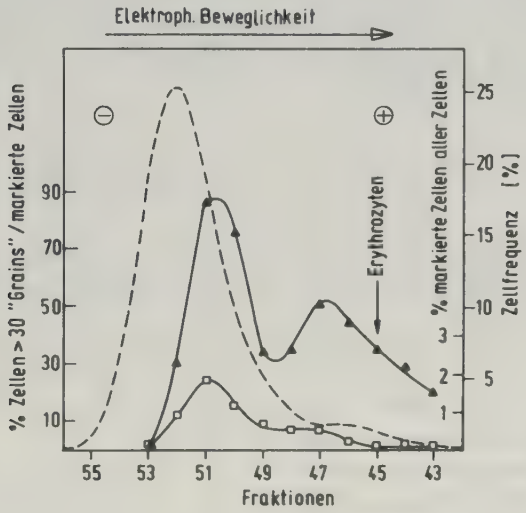


Abb. 24: Häufigkeitsverteilung pulsmarkierter Thymuszellen (^{3}H TdR) nach elektrophoretischer Trennung. (Autoradiographische Auswertung)

□–□ % markierte Zellen aller Thymuszellen

▲–▲ % hochmarkierte Zellen (> 30 Grains) aller markierten Zellen

---- Elektrophoreseprofil von Thymuszellen

Unter der Voraussetzung, daß der relative Anteil markierbarer S-Phase Zellen unter den proliferierenden Populationen gleich ist, spiegeln die in Abb. 24 gezeigten bimodalen Verteilungen auch die quantitativen Verhältnisse wieder:
In ungefährer Übereinstimmung mit den Ergebnissen der DNA-Fluoreszenzanalyse (Abb. 14), verhalten sich die Flächen und somit Zellzahlen von PE1 und PE2 wie fünf zu eins.

Die asymmetrische Verteilung der G1/GO-Phase Zellen über die ganze Breite des Elektrophoreseprofils könnte ein Hinweis dafür sein, daß in dieser Zyklusphase die Differenzierung der Thymuszellen stattfindet (z.B. Veränderung des Glykoproteingehaltes der Außenmembran) und diese Zellen deswegen im "steady state" in allen EB-Bereichen angetroffen werden.

2.3 Tabellarische Zusammenfassung aller Ergebnisse der Zellzyklusanalyse

Die Anwendung verschiedener unabhängiger Marker zur Charakterisierung einzelner Zellzyklusphasen führte zu folgendem Ergebnis:

1. Nach Trennung von Thymozyten im Erdschwerefeld werden zwei überlappende proliferierende Populationen erkannt und die grundsätzliche Möglichkeit der präparativen Trennung von Zellen einzelner Zyklusphasen wird bestätigt (25-27).
2. Nach elektrophoretischer Trennung von Thymuszellen erkennt man zwei proliferierende Populationen unterschiedlicher EB, die sich kaum überschneiden und zumindest im Falle der G2+M- und S-Phase Zellen keine intrazyklische Variation ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit zeigen.

Die Modalwerte für Verteilungen einzelner Phasen, stimmen - wie Tabelle 1 und 2 zeigen - beim Einsatz unabhängiger Marker bei beiden Trennmethoden recht gut überein.

Eine Ausnahme machen S-Phase Marker, die in verschiedenen Stadien der DNA-Synthesephase ein Maximum aufweisen können.

Art der Analyse	Sedimentationsgeschwindigkeit der Modi (mm/Std) ± SD; ( ) Anzahl der Experimente		
	G1/GO	S	G2+M
DNA-Gehalt (Pulszytofluorometrie	3,1 ± 0,1(3)	4,5 ± 0,1(3)* 5,4 ± 0,1(3)*	5,1 ± 0,1(3) 5,9 ± 0,1(3)
Metaphase Blockierung (Pulszytofluorometrie)			5,1 ± 0,1(4) (nicht signifikant)
S-Peak Enzym (Aktiv. d. Sialyltransf.)		± 0,2 4,4(9) ± 0,2 5,4(9)	
Pulsmarkierung, ^{3}HTdR (Autoradiographie, >30 Gr.)		3,8 ± 0,1(3) 5,3 ± 0,1(3)	
Kalkulation von G1** aus den Werten f. M	3,2 ± 0,1(7) 3,7 ± 0,1(3)		

* gemessen bei einem relativen DNA-Gehalt von 1,5; ** aus der Sedimentationsgleichung berechnet; nur gültig für konstante Zelldichten.

Tabelle 1: Modalwerte der Sedimentations- bzw. Elektrophoreseprofile von Thymozyten einzelner Zyklusphasen, die mit Hilfe verschiedener unabhängiger Marker gewonnen wurden.

Art der Analyse	Relative elektrophoretische Beweglichkeit der Modalwerte (Fraktionsabstand zur Peakfraktion von Rattenerythrozyten in Richtung Kathode) ( ) Anzahl der Experimente				
	G1/GO	S		G2+M	
DNA-Gehalt (PZF)	7,5(4)	7(4)	4(4)	7(4)	4(4)
Metaphase Block. (PZF)	7 (2)	6(2)	3(2)	6(2)	3(2)
S-Peak Enzym (Sialyltransf.)		6,5(3)	3(3)		
Pulsmarkierung (Autoradiographie) a) markierte Zellen		6(3)	3(3)		
b) markierte Zellen >30 Grains		6(3)	2,5(3)		

Tabelle 2: Modalwerte der Elektrophoreseprofile von Thymuszellen einzelner Zyklusphasen.

3 Identifizierung der proliferierenden Populationen und Charakterisierung ihrer Differenzierungsstadien mit Hilfe subsequenter Trennungen (zweidimensional).

3.1 Elektrophoretische Beweglichkeit von S-Phase Zellen unterschiedlicher Sedimentationsraten.

Die Tatsache,daß mit Hilfe von Zellzyklusmarkern in den beiden Trennprofilen (Elektrophorese und 1g Sedimentation) insgesamt vier proliferierende Populationen gefunden wurden,legt die Frage nahe, inwieweit diese untereinander identisch sind.

Existieren zwei oder mehrere proliferierende Thymuspopulationen?

Eine Antwort auf diese Frage sollte das Ergebnis subsequenter Trennungen geben:
Vereinigte Fraktionen ^{3}H-Thymidin markierter S-Phase Zellen sowohl der "langsam" sedimentierenden Population PS1 als auch der "schneller" sedimentierenden Population PS2,wurden nacheinander elektrophoretisch getrennt.Dabei wurden die "Pools" (I undII) so gewählt,daß jeweils genügend S-Phase Zellen (vor allem hochmarkierte) der beiden Populationen angereichert sein sollten,die Kontamination von nicht lymphoiden Zellen aber vermieden wurde (Abb.25a).Das autoradiographische Ergebnis (% markierte Zellen x Zellzahl/Fraktion) der subsequent getrennten S-Phase Zellen ist in Abb.25b dargestellt.

Die große Mehrheit der "S"-Zellen beider Pools ist elektrophoretisch langsam (6 Fraktionen zu Rattenerythrozyten);sie bergen jedoch einen geringen Anteil an "S"-Zellen hoher EB,der sich in Form einer anodischen Schulter ausdrückt.

Die Verteilung von Zellen mit mehr als 30 Grains aus Pool I - das Maximum liegt zwischen langsamer und hoher EB - könnte auf Grund ihrer starken Streuung als Summe zweier Einzelverteilungen hochmarkierter Zellen angesehen werden,die zu verschiedenen Anteilen mit hoher bzw. langsamer EB wandern.

Ein ähnliches Abbild einer solchen Summenverteilung gibt die Kurve hochmarkierter Zellen des Pools II (hohe Sedimentationsgeschwindigkeit)

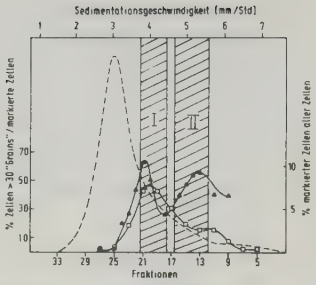


Abb. 25a: Vereinigte Fraktionen (Pool I und Pool II) von S-Phase Zellen geringer bzw. hoher Sedimentationsrate für elektrophoretische Trennungen

(Zeichenerklärung s. Abb. 22)

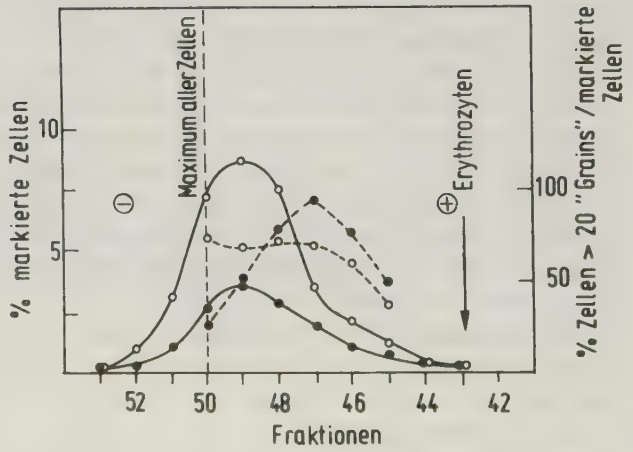


Abb. 25b: Elektrophoretische Verteilung ^{3}H-Thymidin markierter Zellen aus Pool I und II, die nach 1 g Sedimentation gewonnen wurden (Autoradiographische Analyse).

% markierte Zellen aus Pool I (●—●) und II (○—○)

% Zellen>30 Grains von markierten Zellen aus Pool I (●---●) und II (○---○)

wobei der über mehrere Fraktionen konstante Prozentsatz an Zellen mit mehr als 30 Grains auf eine Normalverteilung von S-Phase Zellen im Bereich langsamer EB hinweist.

Geht man davon aus, daß die beiden Pools (I und II) jeweils hohe Anteile der langsamen bzw. schnell sedimentierenden S-Phase Zellen repräsentieren und gegenseitig nicht stark kontaminiert sind, so kann man nach den Ergebnissen der Abb.25b zu folgender Annahme kommen:

1. Die mit verschiedenen Markern für Zellzyklusphasen gefundenen proliferierenden Populationen unterschiedlicher Sedimentationsraten (PS1 und PS2) sind beide bezüglich ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit heterogen.

2. Sie setzen sich jeweils aus einer größeren (Zellzahl) Population geringer EB und einer kleineren Population höherer EB zusammen.

3. Die Summe der elektrophoretischen Verteilungen von Pool I und II ergibt ein quantitatives Verhältnis für S-Phase Zellen höherer EB zu S-Phase Zellen geringerer EB, wie es auch bei der DNA-Fluoreszenzanalyse (Abb.14) gefunden wurde. Bei Identität der Populationen PE1 und PE2 mit den Populationen PS1 und PS2 wäre ein solches quantitatives Verhältnis nicht erklärbar.

Ist aber der Pool II stark kontaminiert mit S-Phase Zellen, die charakteristisch für Pool I sind – bei starker Überlappung der Sedimentationsprofile von PS1 und PS2 durchaus möglich – so ist die Existenz von lediglich drei proliferierenden Lymphozytenpopulationen im Thymus denkbar:

1. Pool I (nur S-Phase Zellen der Population PS1) birgt eine zahlenmäßig große Population geringer EB und eine kleine Population hoher EB.

2. Pool II verteilt sich nach Elektrophorese in eine "große" Zellpopulation geringer EB (kontaminiert von Zellen aus Pool I mit geringer EB) und eine sehr kleine Population (1/5 aller Zellen) hoher EB, die lediglich Ausdruck der Kontamination von S-Phase Zellen hoher EB der langsam sedimentierenden Population PS1 ist.

Diese Interpretationen der Ergebnisse (Abb.25b) gelten nur dann, wenn für die beschriebenen proliferierenden Populationen (zumindest für Zellen der S- und G2/M-Phase) keine intrazyklische EB Variation vorliegt (75, 76 und diese Arbeit II 2.1.3)

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß nach subsequenten Trennungen von Thymozyten durch 1 g Sedimentation und Elektrophorese bei autoradiographischer Analyse der pulsmarkierten Zellen zwar mindestens drei, eventuell vier proliferierende Populationen erkannt werden, aber wegen ihrer hohen Überlappungen bezüglich der Sedimentationsgeschwindigkeit nicht vollständig voneinander getrennt werden können.

3.2 Vergleich der modalen Zellvolumina

In beiden Pools (I und II), die elektrophoretisch getrennt wurden (siehe 3.1), war die Anzahl an Zellen der DNA-Synthesephase gegenüber größeren Zellen der G2/M-Phase dominant. Lediglich Pool I enthielt eine überwiegende Anzahl an Zellen der GO/G1 Phase (siehe Abb.13a).

Ein Vergleich der modalen Volumina von S-Phase Zellen beider Pools (repräsentativ für PS1 und PS2) mit den modalen Volumina von Zellen einzelner Fraktionen nach elektrophoretischer Trennung dieser Pools, sollte Aufschluß über die EB der jeweiligen S-Phase Zellen geben.

Zunächst wurden Zellvolumenhistogramme von denjenigen Fraktionen gewonnen, die den Modalwerten (mm/Std.) der Verteilungen von Zellen einzelner Zyklusphasen nach 1 g Sedimentation entsprechen (siehe Tab.1).

Abb.26a zeigt annähernd normalverteilte Volumenhistogramme von Zellen einzelner Phasen der proliferierenden Population PS1, wobei der Modalwert für S-Phase Zellen bei ca. 140 μm^3 liegt.

Bei der schneller sedimentierenden Population PS2 sind die Volumenhistogramme für Zellen einzelner Zyklusphasen zum Teil stark asymetrisch und breit gestreut (Abb.26b). Dies gibt einen Hinweis auf die Heterogenität der physikalischen Dichte von Zellen gleicher Sedimentationsgeschwindigkeit. Der Mittelwert der asymetrischen Volumenverteilung von S-Phase Zellen kann für diese Population als ca. 170 μm^3 angenommen werden.

Die Volumenverteilungen beider Zellpools (I und II) sind demnach Ausdruck von Summen der Volumenhistogramme einzelner Zyklusphasen, die mit entsprechenden Anteilen in den vereinigten Fraktionen vertreten sind. Jeweils dominierend ist jedoch das oben genannte Volumen für Zellen beider S-Phasen (PS1 bzw. PS2) entsprechend ihrer hohen Anteile in beiden Pools.

Nachdem beide Pools elektrophoretisch getrennt waren, wurden jeweils von Fraktionen langsamer, mittlerer und hoher EB Zellvolumenhistogramme

angefertigt. Das in Abb.27 dargestellte Resultat kann folgendermaßen interpretiert werden:

1. Die modalen Volumina von "großen" Zellen unterschiedlich schneller Fraktionen (L-, M- und H-EB) stimmen gut mit den gefundenen Mittelwerten für S-Phase Zellen der proliferierenden Populationen PS1 und PS2 überein (Abb.26a,b).

2. Die großen Zellen beider getrennten Pools liegen sowohl im langsamen wie im hohen EB Bereich mit jeweils unveränderten Verteilungsformen und modalen Volumina vor.

3. GO/G1 Phase Zellen mit denen beide Pools kontaminiert sind, (s. Abb.13a) verteilen sich im Falle von Pool I lediglich im Bereich langsamer EB und im Falle von Pool II in allen EB-Bereichen bei einer relativen Abnahme an Zellen in Richtung hoher EB.
(H-EB bedeutet 2-3 Fraktionen und L-EB 6-7 Fraktionen langsamer als Rattenerythrozyten).

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse der Volumenkontrollen, daß beide proliferierenden Populationen, die auf Grund ihrer unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten erkannt werden können, elektrophoretisch heterogen sind. Berücksichtigt man die Häufigkeitsverteilungen von Zellen beider Pools nach elektrophoretischer Trennung, so ergibt sich, daß jeweils ein großer Anteil aller S-Phase Zellen mit langsamer EB und ein geringerer Anteil mit höherer EB wandert.

Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen der autoradiographischen Analyse subsequent getrennter Thymuszellen gut überein (s. 3.1.1).

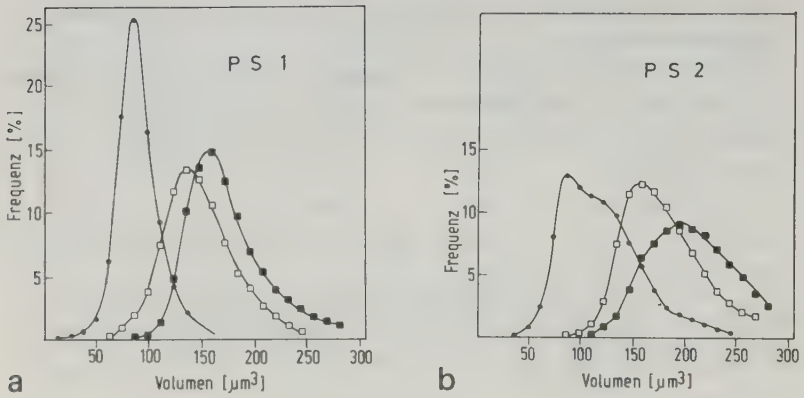


Abb. 26a,b: Volumenhistogramme von Fraktionen die den Modalwerten der Verteilungen (mm/Std.) einzelner Zyklusphasen der proliferierenden Populationen PS1 und PS2 entsprechen (siehe Tab.1).

Volumenverteilungen von Zellen der (●—●) GO/G1-, (□—□) S- und (■—■) G2/M-Phase

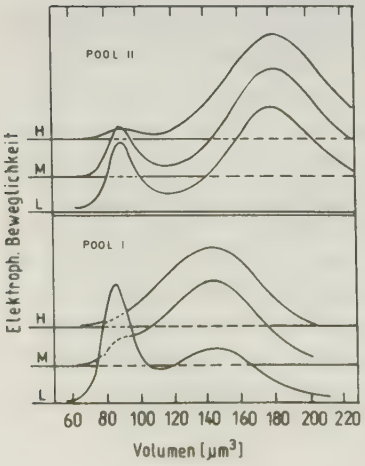


Abb. 27: Volumenhistogramme von Zellen aus Fraktionen der L-, M- und H-Bereiche elektrophoretischer Verteilungen von Pool I und II.

(Vereinigte Fraktionen von Zellen der S-Phasen nach 1 g Sedimentation)

3.3 Der Gehalt Thymus-spezifischer Antigene auf Zelloberflächen getrennter Populationen.

Nachdem die Existenz von mindestens vier proliferierenden Thymozytenpopulationen, die jeweils durch zwei unabhängige physikalische Parameter charakterisiert sind - Oberflächenladungsdichte und Zellvolumen (im Wesentlichen) - sicher zu sein scheint, stellen sich folgende Fragen:

1. Inwieweit sind diese Populationen repräsentativ für einzelne Differenzierungsstadien im Verlauf der Reifung von immuninkompetenten Vorläuferzellen zu immunologisch aktiven T-Lymphozyten?

2. Kann die elektrophoretische Beweglichkeit von Thymozyten auch beim Thymus der Ratte als Ausdruck der Differenzierungsstufe im Verlauf der T-Zellreifung betrachtet werden (19, 30)?

Der Gehalt an Thymozyten-spezifischem Antigen wurde als Marker für den Grad der Differenzierung von proliferierenden Thymozyten betrachtet (39, 66). Deswegen wurden vergleichende Untersuchungen der Absorptionskapazität dieser Zellen für RALTG, ihrem korrespondierenden Antiserum, durchgeführt.

Zunächst wurden Thymuszellen elektrophoretisch getrennt und Fraktionen des H- bzw. L-Bereichs vereinigt (Abb.28a). Anschließend wurden die Zellpools mit Hilfe der 1 g Sedimentationstechnik nochmals getrennt. Fraktionen langsam sedimentierender bzw. schnell sedimentierender Zellen wurden - wie Abb.28b zeigt - aus den jeweiligen Verteilungen zu den Zellpools I, II, III und IV vereinigt.

Die Absorptionskapazität der Zellen (s. Methoden) dieser Pools für RALTG ist in Abb.29 dargestellt.

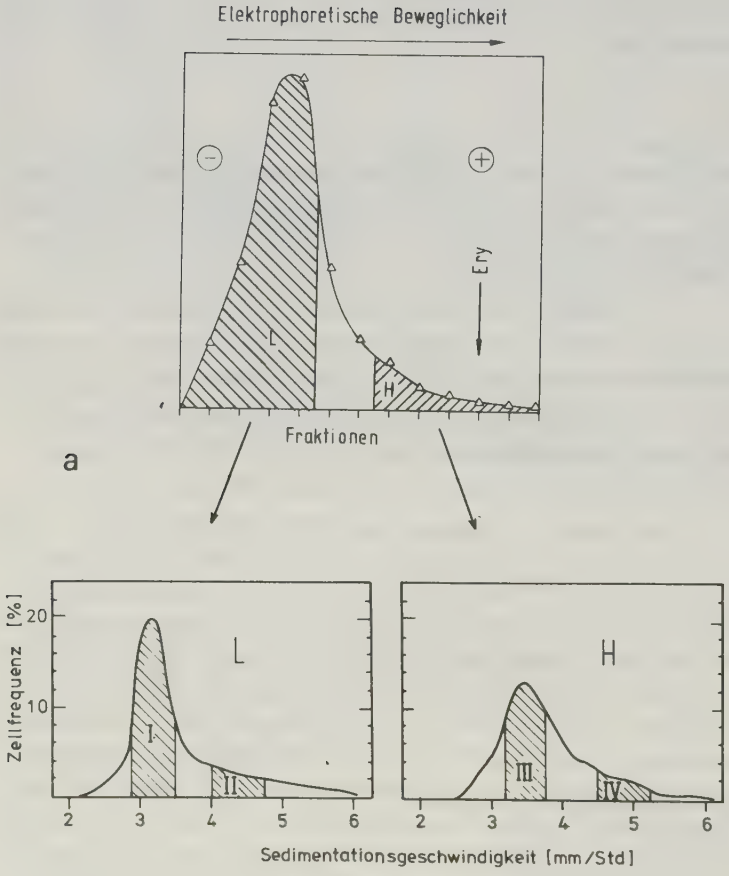


Abb. 28a,b: Subsequente Trennung von Thymozyten.

Nach elektrophoretischer Trennung wurden Fraktionen von Zellen hoher (H) bzw. langsamer (L) Beweglichkeit vereinigt (a) und anschließend mit Hilfe der 1 g Sedimentation weiter getrennt (b). Für Differenzierungsstudien wurden vier Zellpools (I, II, III und IV) gewonnen.

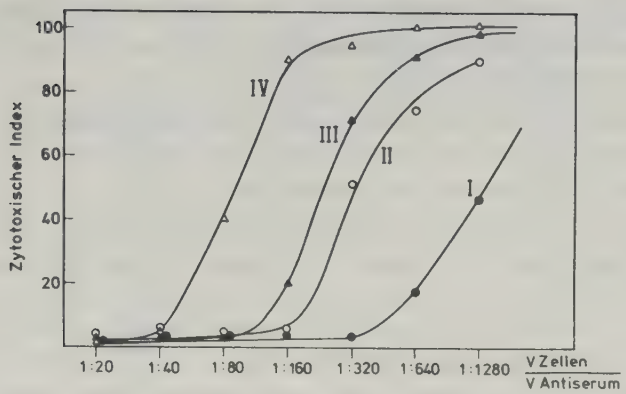


Abb. 29: Absorptionskapazität von proliferierenden Thymus Subpopulationen (charakterisiert durch Pool I-IV) für Antiserum gegen Thymus-spezifisches Antigen.

Zytotoxischer Index von Thymozyten mit RALTG, nach dessen Absorption mit sinkenden Zellmengen der einzelnen Pools.

Vergleicht man die Mischungsverhältnisse (V Zellen/V Antiserum) bei einer 50%igen Absorption der Serumaktivität, so kommt man zu folgendem Ergebnis:

Kleine GO/G1-Phase Zellen des Pool I (vergl. Sed. Geschw. und Volumen) aus dem Bereich langsamer EB besitzen die höchste Absorptionskapazität für RALTG und somit den höchsten Gehalt an Thymozyten-spezifischem Antigen.

Poll II - repräsentativ für S-Phase Zellen mit langsamer EB - zeigt gegenüber Pool I einen geringeren Gehalt an Thy-Antigen, der jedoch etwas über dem von GO/G1- und S-Phase Zellen hoher EB (Pool III) liegt.

Die geringste Menge an Thymus-spezifischem Antigen besitzen Zellen der proliferierenden Populationen aus dem Bereich hoher EB, die auch hohe Sedimentationsgeschwindigkeit aufweisen (Pool IV).

Wird die vorhandene Menge an Thy-Antigen auf Zelloberflächen als Ausdruck fortschreitender Differenzierung von Thymozyten zu peripheren immunkompetenten T-Lymphozyten betrachtet, so kann man die Ergebnisse wie folgt zusammenfassen:

1. Zellen der proliferierenden Populationen im Bereich hoher EB (bestehend aus Anteilen von PS1 und PS2) repräsentieren die differenzierteste Form der Thymus Lymphozyten
2. Zellen der Populationen PS1 und PS2 im Bereich langsamer EB sind auf Grund ihres Thy-Antigengehaltes weniger differenziert, wobei die kleinen GO/G1 Phase Zellen (3mm/Std.) die undifferenziertesten Thymozyten darstellen. Inwieweit die proliferierenden Zellen dieser Populationen (PS1 und PS2) unterschiedlichen Thy-Antigengehalt aufweisen, kann nicht genau geklärt werden und somit keine Reihenfolge der Differenzierung vorgeschlagen werden.
3. Die Oberflächenladungsdichte von Thymozyten der Ratte scheint eine sinnvolle Meßgröße zur Charakterisierung der Differenzierungsstadien der gefundenen proliferierenden Populationen zu sein (29, 30).

3.4 Stimulierbarkeit der proliferierenden Population durch T-Zell Mitogene.

Con A und PHA sind Pflanzenlektine, die in gelöster Form die DNA-Synthese und Zellteilung von T-Lymphozyten - nicht B-Lymphozyten - stimulieren (77).

Ungetrennte Thymozyten (Maus) zeigen ebenfalls diese Reaktionen auf beide Mitogene, wofür lediglich medulläre, Cortison-resistente Zellen (78) und solche mit geringem Gehalt an Θ-Antigen (79) verantwortlich sind.

Um maximale Stimulierungen für Rattenthymozyten des Stammes Wistar zu erhalten, wurden zunächst ungetrennte Thymozyten mit verschiedenen Mengen von Con A und PHA inkubiert. Die erfolgte Stimulierung der DNA-Synthese wurde üblicherweise über den Einbau von ^{14}C-Thymidin bewertet.

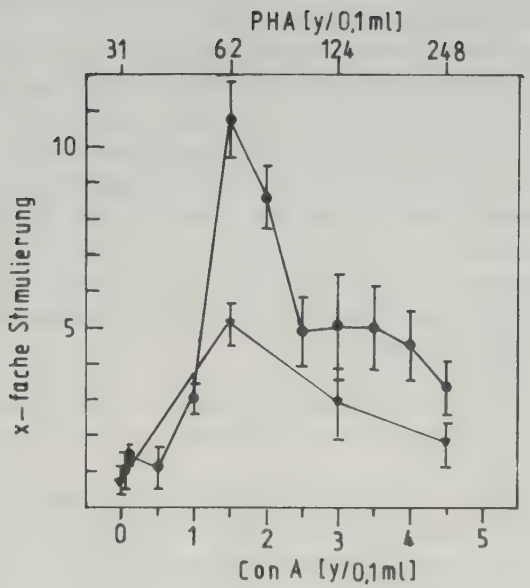


Abb. 30: Titration ungetrennter Thymuszellen der Ratte mit verschiedenen Mengen der Mitogene Con A und PHA.

Konzentration von Con A (●—●) und PHA (▼—▼) in µg/0,1 ml Lösungsmedium. Jede Kultur (1 ml) erhielt davon 0,1 ml.

In Abb. 30 ist für Con A ein deutliches Maximum bei 1,5 y/0,1 ml Kulturmedium zu erkennen, während die optimale Konzentration für PHA bei 62 y/0,1 ml liegt.

Zellen von Pool I, II, III und IV (s. Abb. 22a,b) - jeweils charakteristisch für die vier beschriebenen proliferierenden Thymuspopulationen - wurden 48 Stunden mit der optimalen Dosis Con A und PHA inkubiert.

Das Ausmaß der erfolgten DNA-Synthese (Proliferation) gegenüber unbehandelten Kontrollen, sollte Informationen über den Grad der Differenzierung der oben genannten Populationen geben.

Abb. 31 zeigt, daß "große" proliferierende Zellen der elektrophoretisch schnellen Population (PE2), die nicht von langsam sedimentierenden (3mm/Std.) "kleinen" Thymuszellen kontaminiert sind, die höchste Stimulierbarkeit sowohl durch Con A als auch PHA zeigen (Pool IV).

Kleine Thymozyten von hoher EB (Pool III) und "große" proliferierende von langsamer EB (Pool II) zeigen eine sehr geringe Aktivierung durch beide Mitogene.

Kleine Zellen von geringer Sedimentationsgeschwindigkeit und langsamer EB (GO/G1 Zellen, ca. 80% aller Thymozyten), zeigen keine Stimulierbarkeit durch beide Lektine.

Die äußerst schwache Stimulierbarkeit der Zellen von Pool III, die dem Bereich hoher elektrophoretischer Beweglichkeit entstammen, könnte man folgendermaßen erklären:

Zur mitogenen Stimulierung von Lymphozyten sind möglicherweise sog. "adherent cells" notwendig (79, 80, 83),die auf Grund ihrer Größe (Makrophagen) mit hoher Sedimentationsgeschwindigkeit wandern und daher in Pool III nicht anwesend sind.

Auch die negativen Ergebnisse der Stimulierungen von Zellen des Pool I und Pool II müssen mit Vorsicht interpretiert werden:

1. Nach subsequenten Trennungen könnten Zellen verschiedener Thymuspopulationen trotz positivem Vitalitätstest mehr oder weniger ihre spezifischen Eigenschaften (Rezeptoren), Con A bzw. PHA an ihre Oberfläche zu binden, verloren haben. (Vergl. max. Stimulierung ungetrennter Thymuszellen, Abb. 31, Pool IV)
2. Die Konzentration der eingesetzten Mitogene muß nicht für alle Zellpopulationen gleichermaßen optimal sein.

Immerhin unterstützen die positiven Ergebnisse der Stimulierungsversuche die Tatsache, daß die proliferierende Population hoher EB (PE2)- die sich aus kleinen Anteilen sowohl von PS1 als auch PS2 zusammensetzt- die differenzierteste Form der Thymuslymphozyten darstellt.

Inwieweit proliferierende Zellen von langsamer EB (PE1) - die aus den größeren Anteilen der Populationen PS1 und PS2 bestehen (s. 3.1.1 Abb. 25b) - bezüglich ihrer Differenzierungsstufe heterogen sind, konnte durch die Experimente nicht geklärt werden.

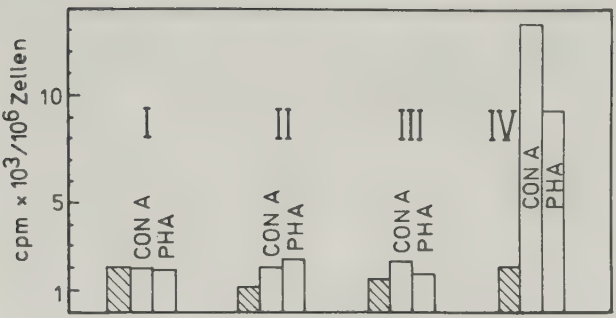


Abb. 31: Mitogene Stimulierung von subsequent getrennten Thymozyten.

Con A bzw. PHA Stimulierbarkeit der Zellen aus Pool I, II, III und IV (s. Abb. 28a,b) gegenüber unbehandelten Kontrollen (▨).

3.5 Untersuchung zur Kinetik der proliferierenden Populationen.

Werden Thymozyten in situ mit ^{3}H-Thymidin markiert, so zeigen nach 1 Std. lediglich Zellen der S-Phase einen Einbau von ^{3}H-TdR. Abb. 32 zeigt ihre Verteilung nach 1 g Sedimentation:

Langsam sedimentierende GO/G1 Phase Zellen, die das Maximum der Verteilung bilden, sind nicht markiert.

Nach 12stündiger ^{3}H-TdR Inkubation - entspricht ungefähr der Zellzykluszeit von Thymozyten der Ratte (81) - verlagert sich das Maximum der Verteilung von markierten Zellen im Sedimentationsprofil in Bereiche höherer Sedimentationsgeschwindigkeiten; gemäß der Markierung von S-Phase Zellen und größeren Zellen der G2/M Phase.

Nur wenige kleine Zellen der GO/G1 Phase (<5%) im Bereich des Verteilungsmaximums sind markiert.

Nach 24 bzw. 72 Stunden sind Thymuszellen aller Sedimentationsbereiche markiert, auch kleine GO/G1 Phase Zellen (85 μm^3).

Die nachfolgende elektrophoretische Trennung der kleinen markierten GO/G1 Phase Zellen (nach 12 - 72 stündiger Markierung) ergab eine Aufspaltung in eine große Population markierter Zellen von langsamer EB und eine kleine Population markierter Zellen hoher EB (vergl. Autoradiographische Analyse, 3.1), d.h. GO/G1 Phase Zellen geringer Sedimentationsgeschwindigkeit (ca. 3 mm/Std.) sind ebenfalls elektrophoretisch heterogen.

Auf Grund ihrer Größe (85 μm^3) sind sie als Teilungsprodukte der Population PS1 zu betrachten. Die entsprechenden Produkte der Population PS2 können wegen ihrer Überlappung mit markierten S-Phase Zellen von PS1 nicht erkannt werden.

Die große Mehrheit aller Thymuszellen sedimentiert demnach mit ca. 3 mm/Std., besitzt ein Volumen von 85 μm^3, ist von langsamer EB und als undifferenziertes Teilungsprodukt zu betrachten (14, 15, 36). Die Produktionsrate kleiner Zellen (Neubildung markierter GO/G1 Phase Zellen im Verlauf von 3 Tagen) im "steady state" (zeitunabhängige Verteilung aller Thymuszellen) der Thymuspopulationen ist auch ein Maß für den Verlust an Zellen dieser charakteristischen physikalischen Eigenschaften (Volumen, Oberflächenladungsdichte), d.h. sie verlassen den Thymus oder werden lysiert (82).

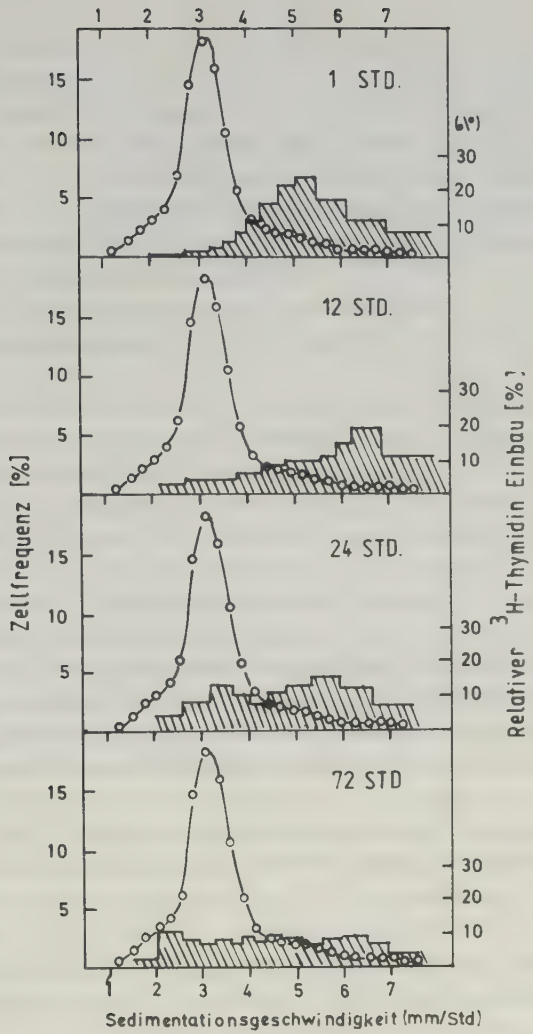


Abb. 32: Kinetik der ^{3}H-Thymidin Markierung von getrennten Thymozyten (1 g Sedimentation).

o–o Sedimentationsprofil von Thymuszellen

▨ relativer ^{3}H-TdR Einbau

IV DISKUSSION

Der Thymus ist als lymphatisches Organ speziell für die Entwicklung der T-Lymphozyten des Immunsystems verantwortlich (84).

Die Reifung von Stammzellen oder Prothymozyten, die dem Knochenmark entstammen, zu immunologisch aktiven und funktionell hoch spezifischen Zellen ist mit einer Reihe kinetischer Prozesse wie Differenzierung, Proliferation und Migration verbunden (6,14,15,34,85-88).

Der Zusammenhang dieser Prozesse ist weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden durch die Wahl der Trennmethoden (1 g Sedimentation und Zellelektrophorese) Untersuchungen zur Proliferation und Membrandifferenzierung von Thymozyten der Ratte ermöglicht.

So konnten durch zweidimensionale Trennung der Zellen und durch Zyklusanalyse mit Hilfe phasenspezifischer Marker eine nicht proliferierende und vier proliferierende Subpopulationen nachgewiesen werden, die sich in ihren zytophysikalischen Eigenschaften voneinander unterscheiden.

Durch den Vergleich ihrer Mengen an thymusspezifischen Oberflächenantigenen und ihrer Stimulierbarkeit durch T-zellspezifische Mitogene konnten die Zellen dieser Subpopulationen teilweise als unterschiedliche Reifestadien der T-Zelldifferenzierung charakterisiert werden.

1 Zusammenhang zwischen Sedimentationsgeschwindigkeit und DNA-Gehalt

Zunächst wurden unter ungetrennten Thymozyten durch zytofluorometrische Bestimmungen des DNA-Gehaltes die Anteile an Zellen einzelner Zyklusphasen bestimmt.

Es zeigte sich eine hohe proliferative Aktivität (9,2 % S- und 5,6 % G2/M-Phase Zellen) wie sie auch in der Literatur für Thymozyten der Maus und Ratte beschrieben wird (14,15,79).

Die zweidimensionale Analyse machte eine hohe positive Korrelation zwischen Volumen und DNA-Gehalt für Zellen der S-Phase sichtbar.

Das Ausmaß der Volumenvariation diploider und tetraploider Zellen deutete an, daß möglicherweise mehrere proliferierende Populationen im Thymus vorliegen, die sich in ihrem mittleren Volumen unterscheiden.

Eine Trennung der Thymozyten nach unterschiedlichen Volumina und somit auch einzelnen Zellzyklusphasen konnte mit Hilfe der 1 g Sedimentationstechnik erreicht werden (25,27).

Durch zytofluorometrische Messung des DNA-Gehaltes von Zellen einzelner Fraktionen wurden die Anteile diploider, tetraploider und DNA synthetisierender Zellen bestimmt. Nach Multiplikation dieser Werte mit der Zellzahl pro Fraktion konnte zum ersten Mal die tatsächliche Verteilung von Zellen einzelner Zyklusphasen im Sedimentationsprofil von Thymozyten gezeigt werden:

Zellen der G1/GO-Phase bilden das Maximum der Gesamtverteilung (ca. 80 % aller Zellen) mit einer modalen Sedimentationsgeschwindigkeit von ca. 3 mm/Std. Ihre Verteilung ist asymmetrisch und erstreckt sich bis in den Bereich hoher Sedimentationsgeschwindigkeit.

Zellen der S-Phase zeigten eine heterogene Verteilung (Schulter) im Bereich mittlerer Sedimentationsgeschwindigkeit. Da eine positive Korrelation zwischen DNA-Gehalt und Volumen besteht, konnte aus der Form dieser Verteilung noch nicht auf die Existenz mehrerer unabhängiger proliferierender Populationen geschlossen werden.

Die annähernd bimodale Verteilung von Zellen der G2/M-Phase im Bereich hoher Sedimentationsgeschwindigkeit deutete allerdings an, daß möglicherweise verschieden große sich teilende Lymphozyten im Thymus existieren. Vor allem die Lage dieser Zellen innerhalb der Verteilung von S-Phase Zellen macht diese Annahme wahrscheinlich.

Erst die Anwendung spezifischer Marker, die ein bestimmtes Ereignis innerhalb der einzelnen Zyklusphase charakterisieren (31) und somit eine geringere Streuung im Sedimentationsprofil aufweisen, brachte Klarheit:

1) Zellen mit mittlerem DNA-Gehalt (1,5)
2) pulsmarkierte Zellen mit mehr als 30 "Grains" und
3) die Sialyltransferaseaktivität (S-Peakenzym) (32,33)

zeigten bezüglich ihrer Sedimentationsraten signifikant bimodale Verteilungen.

4) Nach Metaphaseblockierung mit Colcemid in vivo zeigte sich eine ebenfalls signifikante Akkumulation von Zellen innerhalb der G2/M-Phase.

Dieser Modus lag zwischen den Modi der S-Phase-Verteilung. Da nicht erklärbar ist, daß Zellen der S-Phase schneller sedimentieren als größere G2/M-Phase Zellen der gleichen Population, ist die Existenz von mindestens zwei proliferierenden Populationen unterschiedlicher Sedimentationsraten bewiesen.

Unter Berücksichtigung der Volumenverdoppelung von Zellen im Verlauf eines Teilungszyklus ($S \sim V^{2/3}$) wird die Zusammengehörigkeit einzelner Zyklusphasen je einer proliferierenden Population (PS1 und PS2) erkennbar. Zu PS1 gehören Zellen einzelner Phasen mit einem Volumen von ca. 85 bis 170 μm^3, während Zellen von PS2 über den Volumenbereich von ca. 110 bis 220 μm^3 streuen. 85 % aller Zellen befinden sich in der G1/G0-Phase des Zellzyklus, wovon die Mehrheit laut Literatur die Gruppe kleiner (85 μm^3) nicht proliferierender Thymuszellen bildet (15,79).

Schon Metcalf et al. (14) unterschieden bei ungetrennten Zellen der Maus "große" und "mittelgroße" sich teilende Thymuslymphozyten ohne die zellzyklusabhängige Volumenvariation zu berücksichtigen.

Andere Autoren, die Thymozyten mit Hilfe der 1 g Sedimentation trennten (85,86), konnten lediglich zwischen großen proliferierenden und kleinen nicht proliferierenden Zellen unterscheiden.

Die vorliegende Untersuchung ist detaillierter und zeigt, daß sich selbst beliebig kleine Fraktionen bestimmter Sedimentationsgeschwindigkeit aus Zellen einzelner Zyklusphasen von verschiedenen Populationen zusammensetzen. Der Grund dafür ist ihr großer Überlappungsbereich.

2 Elektrophoretische Beweglichkeit als Ausdruck der Differenzierung von Subpopulationen

Die gleiche Art der Zellzyklusanalyse wurde an elektrophoretisch getrennten Thymozyten durchgeführt, um Differenzierungsunterschiede von proliferierenden Populationen bzw. von Zellen einzelner Zyklusphasen (intrazyklische Variation der EB) zu erkennen.

Zeiller et al. (29) konnten für die Maus durch Studien über die Abnahme Thymus-spezifischen Θ-Antigens und Zunahme von Eigenschaften immunkompetenter peripherer T-Lymphozyten (GvH-Reaktion, Helfer-Zell-Effekt) zeigen, daß die T-Zelldifferenzierung im Thymus mit der schrittweisen Erhöhung der EB einhergeht.

Dementsprechend kann in der vorliegenden Arbeit eine differenziertere Population hoher EB (PE2) von einer weniger differenzierten Population langsamer EB (PE1) unterschieden werden. Ihre jeweiligen G2/M- und S-Phase Zellen scheinen normal verteilt zu sein, stimmen in ihren Mittelwerten überein und zeigen deswegen keine intrazyklische Variation der EB.

Schließt man analog auf eine Invarianz des Antigenmusters, so wird die Einteilung von Thymuslymphozyten in proliferierende, den ganzen Zyklus umfassende Subpopulationen, sinnvoll. Als solche charakterisieren sie verschiedene Differenzierungsstufen im Laufe der T-Zellreifung.

Aus dem kontinuierlichen Übergang der G1/GO-Phase Zellen von langsamer zu hoher EB könnte man vermuten, daß in diesen Zyklusstadien die Differenzierung von Thymuszellen, d.h. die Produktion und Ausprägung von Differenzierungsantigenen vonstatten geht. Da aber G1/GO-Phase Zellen mit den eingesetzten Analysemethoden nicht diskriminiert werden konnte, kann auch nicht entschieden werden, ob die Differenzierung von Thymozyten zu immunkompetenten T-Zellen lediglich <u>außerhalb</u> des Zellzyklus stattfindet.

Anhang weniger untersuchter Systeme wurde die Zelldifferenzierung bei Säugetierzellen als Ausdruck einer Genexpression in Abhängigkeit von DNA-Synthese bzw. Zellteilung gefunden.

Dennoch konnten z.B. B-Lymphozyten durch Mitogene zur Differenzierung und Antikörperproduktion aktiviert werden, ohne daß eine DNA-Synthese und Zellteilung erfolgte (87). Auch im Thymus ist der erste Differenzierungsschritt vom Prothymozyt zum Thymozyten bei der Maus zumindest in vitro unabhängig von der DNA-Synthese und Zellteilung (88,89).

3 Zur Identifizierung und Differenzierungsfolge der beschriebenen Subpopulationen

Die in beiden Trennprofilen (1 g Sedimentation und Elektrophorese) gefundenen proliferierenden Populationen PS1 und PS2 bzw. PE1 und PE2 sind untereinander nicht identisch. Durch subsequente Trennungen (zuerst 1 g Sedimentation, dann Elektrophorese) konnte die Heterogenität der Zellen sowohl von PS1 als auch PS2 bezüglich ihrer EB (Grad der Differenzierung) bewiesen werden.

Wegen der starken Überlappung von PS1 und PS2 wurde jeweils die elektrophoretische Verteilung markierter S-Phase Zellen geprüft, die durch Vereinigen von Fraktionen nach 1 g Sedimentation jeweils hoch angereichert werden konnten. Als zusätzlicher Marker wurde das modale Volumen dieser markierten Zellen berücksichtigt.

Der größere Anteil der Zellen sowohl von PS1 als auch PS2 wandert im Bereich langsamer EB (PE1) und nur ein geringer Anteil (ca. 30 %, bzw. 25 %) ist elektrophoretisch schnell (PE2).

Es zeigte sich, daß beide proliferierende Populationen, die mit Hilfe von Zellzyklusmarkern im Sedimentationsprofil erkannt werden können, jeweils eine kleine (Zellzahl) differenziertere proliferierende Population bergen (siehe Abb. 27).

Die größere Menge (ca. 80 %) der kleinen G1/GO-Phase Zellen von geringster Sedimentationsgeschwindigkeit zeigt auch die langsamste EB und ist demnach die in der Literatur beschriebene nicht proliferierende Thymozytenpopulation (29,82).

Somit können im zweidimensionalen Feld (EB gegen Sed.Geschw.) vier proliferierende und eine nicht proliferierende Thymussubpopulation dargestellt werden, die sich in ihren zytophysikalischen Eigenschaften unterscheiden (Abb.33).

Der Gehalt an Differenzierungsantigenen und die Stimulierbarkeit dieser fünf Subpopulationen durch T-zellspezifische Mitogene, charakterisierten ihren immunologischen Reifegrad.

Die höchste Absorptionskapazität für RALTG und somit den höchsten Gehalt an Thy-Antigen zeigten kleine, nicht proliferierende GO/G1-Phase Zellen von geringster EB.

Beide proliferierenden Populationen im Bereich langsamer EB zeigten einen geringeren Gehalt an Thy-Antigen.

Die schwächste Absorptionskapazität für RALTG und somit der geringste Gehalt an Thy-Antigen wurde bei Zellen beider proliferierenden Populationen aus dem Bereich hoher EB gemessen.

Diese Befunde stimmen mit der Literatur für Ratte und Maus gut überein (19,,29,66,79). Nach Goldschneider (39) sind auch Heteroantigene speziell bei der Ratte als brauchbare Marker für die T-Zelldifferenzierung zu betrachten. Das Thy-Antigen ist mit dem Θ-Antigen der Maus vergleichbar. Der Gehalt an Thy-Antigen auf der Zelloberfläche ist also auch bei der Ratte mit dem Reifegrad von Thymuslymphozyten negativ korreliert.

Mit den T-zellspezifischen Mitogenen Con A und PHA sind lediglich Zellen von hoher EB stimulierbar.

In Einklang mit den Befunden von Shortman (79) wird bestätigt, daß die beiden proliferierenden Populationen hoher EB auch durch ihre positive Antwort auf T-Zell Mitogene als immunologisch reifere Zellen zu betrachten sind. Die Mehrheit aller proliferierenden Zellen und die nicht proliferierende Population kleiner GO/G1 Zellen zeigt keine signifikante Stimulierbarkeit durch Con A und PHA, besitzt relativ hohen Gehalt an Thy-Antigen, ist von langsamer EB und kann somit als immunologisch unreif angesehen werden.

Inwieweit können Beziehungen der fünf Populationen untereinander nachgewiesen werden?

Die Einbaukinetik von ^{3}H-TdR an getrennten Thymuszellen (1 g Sedimentation) zeigte analog zu Befunden bei der Maus (90), daß die große Menge kleiner GO/G1-Phase Zellen Teilungsprodukte von PS1 sind. Nachdem sie mit geringer EB wandern, kann man annehmen, daß sie von den proliferierenden Zellen aus PS1 stammen, die ebenfalls geringe EB aufweisen.

Nach Metaphaseblockierung mit Colcemid in vivo, wurden ausschließlich Zellen von PE1 akkumuliert. Diese sind daher Vorläufer der differenzierteren Zellen von PE2.

Eine eindeutige Abhängigkeit zwischen PS1 und PS2 konnte nicht nachgewiesen werden, da nicht erkennbar war, ob lediglich Zellen der Metaphase von PS1 und nicht auch von PS2 angestaut wurden.

Daher können - wie Abb.33 zeigt - zwei parallel laufende Linien der T-Zelldifferenzierung vorgeschlagen werden, die durch je zwei proliferierende Populationen unterschiedlicher Reifestadien charakterisiert sind. Die stufenlose Differenzierung findet möglicherweise außerhalb des Teilungszyklus in einem Kompartment statt, das im Rahmen dieser Methoden nicht weiter unterteilt wurde (GO + G1 Phase).

Beide Linien können auf Grund verschiedener mittlerer Sedimentationsgeschwindigkeiten (Volumina) unterschieden werden. Sie stellen als solche die Verbindung zwischen den vom Knochenmark einwandernden immuninkompetenten Prothymozyten zu reifen, immunologisch aktiven, peripheren T-Zellen dar. Ob dies der Ausdruck der beiden für Maus und Ratte beschriebenen, funktionell unterschiedlichen T-Zellinien ist (39,82,91,92), die in ihrer Entwicklungsfolge im Thymus unabhängig voneinander ablaufen, konnte im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nicht geklärt werden.

Eine weitere Frage ist die Funktion und das Schicksal der großen Anzahl (ca. 80% aller Zellen) kleiner, inaktiver Thymozyten von geringer EB und höchstem Thy-Antigengehalt, die möglicherweise aus den proliferierenden Thymozyten durch asymetrische Teilung (14) hervorgehen und zu "ruhenden" GO-Phase Zellen werden. Ob sie aus diesem Kompart-

ment zurück in den Zellzyklus (PS1) laufen können, bleibt ungeklärt. Zumindest aber muß ein großer Anteil dieser kleinen Zellen (s. Kinetik der ^{3}H-TdR Markierung, 3.5) entweder in die Peripherie emigrieren - wo sie allerdings nie im angereicherten Maße vorgefunden wurden - oder im Thymus sterben (14,82,93).

Das vorliegende Modell (Abb.33) ist das Resultat kombinierter Trennungen und zeigt eine Synthese bisheriger Untersuchungen, die sich im Wesentlichen mit Proliferation oder Differenzierung von Thymuslymphozyten beschäftigt haben.

Durch den Einsatz phasenspezifischer Marker konnten sowohl die Differenzierungsstufen der proliferierenden Populationen als auch ihre teilungsabhängige Variation der Verteilung von Volumen und EB bestimmt werden. Während der Teilung - zumindest in der S- und G2-Phase - scheint die Differenzierung der Zellen nicht zu erfolgen.

Die gleichzeitige Erfassung mehrerer variabler Zelleigenschaften mit spezifischen Methoden verspricht ein prinzipieller Weg zu sein, die komplizierten Verhältnisse der T-Zelldifferenzierung im Thymus zu analysieren.

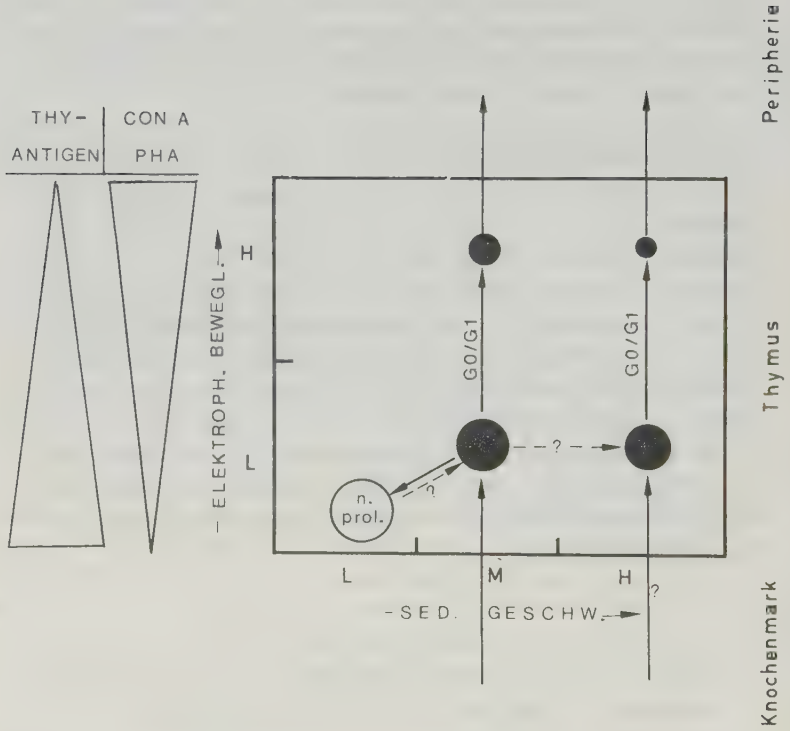


Abb.33: Hypothetisches Schema der T-Zelldifferenzierung im Thymus

Zweidimensionale Darstellung der experimentell gefundenen Subpopulationen.

- ● proliferierende Populationen (ca. 15% aller Thymuszellen)
- ○ nicht proliferierende Population (ca. 80% aller Thymuszellen)

L: langsame, M: mittlere, H: hohe Sedimentationsgeschwindigkeit bzw. EB.

V ZUSAMMENFASSUNG

Durch zytofluorometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes ungetrennter Thymozyten, konnte die hohe proliferative Aktivität des Thymus gezeigt werden.

85,2% aller Zellen befinden sich in der G1/GO-Phase, 9,2% in der S-Phase und 5,6% in der G2/M-Phase des Zellzyklus.

Die gleichzeitige Analyse der Zellvolumina zeigte die unterschiedliche Größe diploider, tetraploider und DNA synthetisierender Zellen, und darüberhinaus eine Volumenheterogenität der Zellen einzelner Zyklusphasen.

Mit Hilfe der 1g Sedimentation konnten unterschiedlich große Thymozyten voneinander getrennt werden.

Die Analyse des DNA-Gehaltes von Zellen einzelner Fraktionen und vor allem der Einsatz phasenspezifischer Marker charakterisierten das Sedimentationsprofil von G1/GO-, S- und G2/M-Phase Zellen:

Zellen mit mittlerem DNA-Gehalt (1,5), pulsmarkierte Zellen mit mehr als 30 "Grains" und die Sialyltransferaseaktivität (S-Peak-Enzym) waren bimodal verteilt.

Zellen, die in der Metaphase blockiert waren, zeigten eine Verteilung, deren Maximum zwischen den beiden Modi der S-Phase Zellen lag. Der Zusammenhang einzelner Zyklusphasen wurde erkannt, so daß sich zwei proliferierende Populationen unterschiedlicher mittlerer Sedimentationsgeschwindigkeit ergaben. Sie umfassen einen Volumenbereich von 85 - 170 μm^3 bzw. 110 - 200 μm^3 und überlappen daher stark im Sedimentationsprofil.

Ca. 85% der Zellen sedimentieren mit ca.3mm/Std., haben ein Volumen von 85 μm^3 und sind Teilungsprodukte (^{3}H-TdR Einbaukinetik), die sich in der GO/G1-Phase befinden.

Mit der gleichen Art der Zellzyklusanalyse konnte unter elektrophoretisch getrennten Thymuszellen eine proliferierende Population geringer EB und eine differenziertere Population hoher EB erkannt werden. Eine zyklusabhängige Variation der EB konnte zumindest für S- und G2-Phase Zellen nicht festgestellt werden, d.h. die beiden Populationen zeigten keine Überlappung. Ca. 80% aller

Zellen wandern mit geringster EB und befinden sich in der GO/G1-Phase des Zellzyklus.

Die in beiden Trennprofilen gefundenen proliferierenden Populationen sind untereinander nicht identisch:

Durch subsequente Trennungen der Zellen (zuerst 1g Sedimentation, dann Elektrophorese) konnte gezeigt werden, daß beide Populationen unterschiedlicher mittlerer Sedimentationsgeschwindigkeit zum größeren Anteil mit geringer EB wandern. Sie bergen aber jeweils eine kleine proliferierende Population hoher EB. Der Beweis wurde mit Hilfe pulsmarkierter Zellen (Autoradiographie) und ihrer charakteristischen Volumina geführt.

Es konnten daher auf zweidimensionale Weise (EB gegen Sedimentationsrate) vier proliferierende und eine nicht proliferierende (Teilungsprodukte) Thymussubpopulation dargestellt werden, die sich in ihren zytophysikalischen Eigenschaften voneinander unterscheiden.

Beide proliferierenden Populationen hoher EB repräsentieren reifere Stadien der T-Zelldifferenzierung, da sie eine positive Antwort auf Con A und PHA geben und den geringeren Gehalt an Thy-Antigen aufweisen.

Ihre unreifen Vorläufer sind Zellen der proliferierenden Populationen langsamer EB, da nur diese eine Zellakkumulierung nach Metaphaseblockierung mit Colcemid zeigten.

Zwischen dem Grad der Differenzierung und der EB besteht also eine positive Korrelation.

Ein Zusammenhang zwischen den proliferierenden Populationen unterschiedlicher Sedimentationsraten konnte nicht gefunden werden.

Es wird ein Modell der T-Zellentwicklung im Thymus diskutiert, das durch zwei voneinander unabhängige Differenzierungslinien gekennzeichnet ist. Jede Linie wird durch je zwei proliferierende Populationen unterschiedlicher Reifestadien charakterisiert.

VI ABKÜRZUNGEN

T Zellen	Thymus abhängige Lymphozyten
B Zellen	Thymus unabhängige Lymphozyten
Thy	Thymus
EB	Elektrophoretische Beweglichkeit
L-	" " langsam
H-	" " hoch
Θ-Antigen	Thymozyten spezifisches Antigen (Alloantigen, Maus)
Ly-Antigen	Lymphozyten spezifisches Antigen (Alloantigen, Maus)
H-2 Antigen	Histokompatibilitätsantigen (Alloantigen, Maus)
Thy-Antigen	Thymozyten spezifisches Antigen (Heteroantigen, Ratte)
anti-Thy (RALTG)	Antiserum gegen Thymozyten spezifisches Antigen (Heteroantiserum, Ratte)
anti-T	" " T-Zell spezifisches Antigen (Heteroantiserum, Ratte)
G1/GO Phase	Präsynthetische (postmitotische) Phase des Zellzyklus
S-Phase	DNS-Synthesephase
G2-Phase	Postsynthetische (prämitotische) Phase
M-Phase	Mitosephase
PMZ	Prozentsatz radioaktiv markierter Zellen
TCA	Trichloressigsäure
BSA	Rinderserumalbumin
CMP	Cytidinmonophosphat
GAL	Galaktose
IgG	Immunglobulin Typ G
Con A	Concanavalin A
PHA	Phytohämagglutinin

VII LITERATURVERZEICHNIS

1. Jacob, F. and Monod, I.
   Cold Spring Harbor Symposium Quantitatic Biology (1961)

2. Clark, S.L.
   Contemp.Top.Immunbiol., 2,77 (1973)

3. Raviola, E. and Karnófsky, M.I.
   J.exp.Med., 136,466 (1972)

4. Smith, C., Thatcher, E.L., Kraemer, D.Z. and Holt, E.S.
   J.Morph. 91,199 (1952)

5. Levine, M.A. and Claman, H.N.
   Science, 167,1515 (1970)

6. Schlesinger, M.
   Prog.Allergy, 16,214 (1972)

7. Blomgren, H. and Anderson, B.
   Cell.Immunol., 1,545 (1971)

8. Takiguchi, T., Adler, W.K. and Smith, R.T.
   Cell.Immunol., 2,373 (1971)

9. Raff, M.C. and Owen, J.J.T.
   In: Morphological and functional Aspects of Immunity
   p.11, Plenum Press New York (1971)

10. Leckband, E. and Boyse, E.A.
    Science, 172,1258 (1971)

11. Cohen, J.J., Fischbach, M. and Claman, H.N.
    J.Immunol., 105,1146 (1970)

12. Cohen, J.J. and Claman, H.N.
    J.exp.Med., 133,1026 (1971)

13. Graeves, M.F. and Janossy, G.
Transpl.Rev., 11,87 (1972)

14. Metcalf, D. and Wiadrowsky, M.
Cancer Res., 26,483 (1966)

15. Borum, K.
Cell and Tissue Kin., 6,545 (1973)

16. Hannig, K.
In: Progress in Separation and Purification
Vol.2, p.45 (T.H.Gerritsen,ed.)

17. Hannig, K. and Zeiller, K.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem., 350,467 (1969)

18. Hannig, K.
In: Methods in Microbiology,Vol.5B, p.513
(J.R. Norris and D.W. Ribbons, eds.) Academic Press, London (1971)

19. Zeiller, K. and Hannig, K.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem., 352,1162 (1971)

20. Zeiller, K., Hannig, K. and Pascher, G.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem., 352,1168 (1971)

21. Zeiller, K., Holzberg, E., Pascher, G. and Hannig, K.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem., 353,105 (1972)

22. Mel, H.C., Mitchell, L.T. and Thorell, B.
Blood, 25,63 (1965)

23. Peterson, E.A. and Evans, W.H.
Nature (London), 214,824 (1967)

24. Miller, R.G. and Phillips, R.A.
J.Cell.Physiol., 73,191 (1969)

25. McDonald, H.R. and Miller, R.G.
Biophysical Journal, 10 (1970)

26. Everson, L.K.
J.exp.Med., 137,343 (1973)

27. Williams, N. and Moore, M.
J.Cell.Physiol., 82,81 (1973)

28. Shortman, K., v. Boehmer, H., Lipp, J. and Hopper, K.
Transplant-Rev., 25,163 (1975)

29. Zeiller, K., Pascher, G., Wagner, H., Liebich, HG., Holzberg, E. and Hannig, K.
Immunology 26,995 (1974)

30. Zeiller, K., Schindler, R.K. and Liebich, HG.
Isr.J.Med.Sci., 11,1242 (1975)

31. Mitchison, J.M.
In: The Cell Cycle, p.361
(Padilla, G.M., Whitson, G.L. and Cameron, J.L., eds)
Academic Press, New York and London (1969)

32. Bosmann, H.B.
Biochem.Biophys.Acta, 339,438 (1974)

33. Bosman, H.B.
Arch.Biochem.Biophys., 145,310 (1971)

34. Weissman, I.L.
J.exp.Med., 126,291 (1967)

35. Potmesil, M. and Goldfeder, A.
Exp.Cell Res., 77,31 (1973)

36. Bryant, B.J.
Europ.J.Immunol., 2,38 (1972)

37. Balch, C.M. and Feldman, J.D.
J.Immunol., 112,79 (1974)

38. Goldschneider, I. and McGregor, D.D.
J.exp.Med., 138,1443 (1973)

39. Goldschneider, I.
Cellular Immunology, 24,289 (1976)

40. Miller, R.G.
In: Techniques in Biophysics and Cell Biology Vol.1,p.87
(Pain, R. and Smith, B., eds.), Wiley, London (1973)

41. Zeiller, K., Hansen, E., Leihener, D., Pascher, G. and Wirth H.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem., 357,1309 (1976)

42. Wiig, I.N.
Scand.J.Immunol., 4,474 (1974)

43. Despont, J.P., Abel, C.A. and Grey, H.M.
Cell.Immunol., 17,487 (1975)

44. Zeiller, K. and Schindler, R.K.
Behring Institut Mitteilungen, 55, 246 (1974)

45. Zeiller, K., Löser, R., Pascher, G. and Hannig, K.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem., 356,1225 (1975)

46. Hannig, K., Wirth, H., Meyer, B.H. and Zeiller, K.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem., 356,1209 (1975)

47. Hannig, K., Wirth, H., Schindler, R.K. and Spiegel, K.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem., 358,753 (1977)

48. Kachel, V.
J.Histochem.Cytochem., 24,211 (1976)

49. Thom, R. and Kachel, V.
Blood, 21,48 (1970)

50. Crissman, H.A. and Tobey, R.A.
Science, 184,1297 (1974)

51. Kachel, V., Glossner, E., Kordwig, E. and Ruhenstroth-Bauer, G.
J.Histochem.Cytochem., 25,7 (1977)

52. Dittrich, W. and Goedhe, W.
Z.Naturforschung, 24b,360 (1969)

53. Dean, P.N. and Jett, J.H.
J.Cell Biol., 60,523 (1974)

54. Bhattachraya, C.G.
Biometrics, 23,115 (1967)

55. Howard, A. and Pelc, S.R.
J.Exp.Cell.Res., 2,178 (1951)

56. Howard, R. and Pelc, S.R.
Heredity, 6,261 (1953)

57. Weiger, G.W.
Persönl. Mitteilungen

58. Joftes, D.L. and Warren, S.H.
J.biol.photogr.Ass., 23,145 (1955)

59. Leblond, C.P., Kopriwa, B. and Messier, B.
In: Histochemestry and Cytochemestry (1969)
(Proc.first Intern.Congr.Paris 1969; E. Wegmann, ed.)
Sympos.Publ.Div. 1. Oxford-London-New York-Paris, Pergamon Press

60. Dulley, I.R. and Grieve, P.A.
Anal.Biochem., 64,136 (1975)

61. Tannock, I.F.
Exp.Cell Res., 47,345 (1967)

62. Boyse, E.A. and Old, L.J.
Ann.Rev.Gent., 3, 269

63. Waksman, B.H.
Transplant.Rev., 6,30 (1971)

64. Iverson, I.G.
Clin.Exp.Immunol., 6,101 (1970)

65. Hudson, L. and Roitt, I.M.
Europ.J.Immunol., 3,63 (1973)

66. Zeiller, K. and Dolan, L.
Europ.J.Immunol., 2,439 (1972)

67. Zeiller, K. and Pascher, G.
Europ.J.Immunol., 3,614 (1973)

68. Colley, D.G., Malakian, A. and Waksman, B.H.
J.Immunol., 104 585 (1970)

69. Janossy, G. and Graeves, M.F.
Clin.Exp.Immunol. 9,483 (1971)

70. Blomgren, H. and Svedmyr, E.
Cell.Immunol., 2, 285 (1971)

71. Shortman, K., Byrd, W., Carottini, I.C. and Brunner, K.T.
Cell.Immunol., 6,12 (1973)

72. Anderson, E.C., Bell, G.I., Petersen, D.F. and Tobey, R.A.
Biophysical Journal, 9,246 (1969)

73. Tobey, R.A. and Crissman, H.A.
Exp. Cell res. 93,235 (1975)

74. Valet, G., Hanser, G. and Ruhenstroth-Bauer, G.
In: Pulse-Cytophotometry, III,127 (1978) (in press: European Press Medikon, Gent 1978)

75. Kraemer, P.M.
J.Cell. Physiol. 67,23 (1966)

76. Kraemer, P.M.
J.Cell. Biol. 33,197 (1967)

77. Greaves, M.F. and Janossy, G.
Transpl. Rev., 11,87 (1972)

78. Jacobsson, H. and Blomgren, H.
Cell.Immunol. 11,427 (1974)

79. Shortman, K., Ryden, A., Dunkley, M. and v.Boehmer, H.
Aust. J. Exp. B. 55,585 (1977)

80. Lohrmann, H.-P., Novikovis, L. and Graw, R.G.jr.
J.Exp. Med., 139,1553 (1974)

81. Fabrikant, J.I. and Foster, B.R.
Hopkins Med. J. 130,208 (1972)

82. Shortman, K.
In: Progress in Immunology III,197
(Mandel, T.E., Cheers, Ch., Hoskin, C.S., Mc Kenzie, J.F.C. and Nossal, G.J.V., eds.) North-Holland Publishing Company (1977)

83. Rosenstreich, D.L., Farrar, J.J. and Dougherty, S.
J. Immunol. 116,131 (1976)

84. Miller, J.F.A.P. and Osoba, D.
Physiol. Rev. 47, 437 (1967)

85. Shortman, K. and Jackson, H.
Cell. Immunol. 12, 230 (1974)

86. Fathman, C.G., Small,M., Herzenberg, L.A. and Weissman, J.L.
Cell. Immunol. 15, 109, (1975)

87. Melchers, F.
In: Respectives in Membrane Biology, p. 531
(Estrado-O.S. and Gittler, C. eds.) Academic Press (1974)

88. Cantor, H. and Boyse, E.A.
Immunol. Rev. 33, 304 (1977)

89. Storrie, B., Goldstein, G., Boyse, E.A. and Hammerling, U.
J. Immunol. 116, 1358 (1976)

90. Cantor, H. and Weissman, J.
Prog. Allergy, 201, 1 (1976)

91. Droege, W. and Zucker, R.
Trans. Rev. 25, 3 (1975)

92. Huber, B., Cantor, H., Shen, F.W. and Boyse, E.A.
J. exp. Med. 144, 1976

93. Feinendegen, C.E., Heiniger, H.J., Friedrich, G. and Cronkite, E.P.
Cell Tissue Kinet. 6, 573 (1973)

Lebenslauf

Am 4. Dezember 1945 wurde ich als Sohn des Diplomingenieurs Dr. Otto Leihener und seiner Ehefrau Maria, geb. Graff, in Wuppertal-Cronenberg geboren.
Aus beruflichen Gründen meines Vaters erfolgten zahlreiche Umzüge der Familie, die für mich mit häufigem Schulwechsel verbunden waren: Die Grundschule besuchte ich in Engelskirchen und Bochum-Stiepel und anschließend die Gymnasien in Sulzbach-Rosenberg, Marquartstein und zuletzt Miesbach, wo ich 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1967 begann ich mit dem Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen und legte dort 1973 die Diplomprüfung in diesem Fach ab.

Von September 1973 bis März 1975 arbeitete ich im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. K. Zeiller an meiner Diplomarbeit mit dem Thema: "Physikalische Trennung und Charakterisierung von Lymphozyten-Subpopulationen des Rattenthymus."

Unter der gleichen Leitung fertigte ich von Mai 1975 bis Mai 1978 die vorliegende Dissertation in diesem Institut an, in dem ich auch jetzt als Forschungsstipendiat tätig bin.

Ich heiratete 1967 und habe zwei Kinder.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten:

E. Bayer, E. Bünning, K.G. Grell, H. Guglielmi, W. Kretschmar, W. Loeffler, K. Mägdefrau, H. Mauser, H. Metzner, G.F. Meyer, H. Möhres, E. Müller, C. Pelling, A. Rieker, W. Schweizer, B. Schwemmle, H. Stegmann, H. Tichy, K. Wegmann, G. Weitzel, U. Weser, H. Zähner

ifo druck
laubanger 15
8600 bamberg
tel.: 0951/6 43 21